Microbiología Española

III-IV
1

MCMXLVII

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
28 MAR 1960

SUMARIO

Conferencias y Comunicaciones

Adquisiciones recientes de sifilografía experimental, por el Dr. A. Bessemans.

El núcleo de las células de levadura, por Arsenio Fraile Ovejero.

Variaciones de la riqueza en ácido nicotínico de diversas levaduras, por Juan Marcilla Arrazola y Pilar Aznar Ortiz.

Estudio bacteriológico de los aerobios heterotróficos de las ostras, por Juan Blanco Díez del Valle.

Contribución al estudio de la determinación, en las tierras, del ácido fosfórico asimilable por vía biológica, por Pedro Baudín Sánchez y Javier Cremades Adaro.

Actas de la Sociedad:

Acta de la Sesión del dia 6 de Octubre de 1947.
Acta de la Sesión del día 3 de Noviembre de 1947.
Acta de la Sesión del día 1 de Diciembre de 1947.

Otras Actividades de la Sociedad:

Secretaría: Cuarto Congreso Internacional de Microbiología de Copenhague.

Tercera lista de Sres. Socios.

Bibliografía.

SE SUPLICA EL CAMBIO
ON DÉSIRE L'ÉCHANGE
MAN BITTET DEN WECHSEL
WE BEG THE CHANGE

TODA LA CORRESPONDENCIA A NOMBRE DE DON LORENZO VILAS, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS, CALLE DE SERRANO, 121 — MADRID

Microbiologia Española

III-IV
1

MCMXLVII

TALLERES GRAFICOS MONTAÑA — TELEF. 27-45-73 — MADRID

ADQUISICIONES RECIENTES DE SIFILIOGRAFIA EXPERIMENTAL

Conferencia dada en Noviembre de 1.946, en Madrid, y en las Facultades de Medicina de las Universidades de Oporto, Lisboa y Coimbra, así como en Febrero de 1.947 en la Facultad de Medicina de la Universidad de Lila.

Por el Profesor Dr. A. Bessemans

Director del Instituto de Higiene y Bacteriología de la Universidad del Estado, de Gante (Bélgica)

Las nociones objeto de la presente exposición son debidas, en su mayor parte, a investigaciones personales efectuadas en nuestro laboratorio con la cepa sifilítica llamada *Gand* que aislamos en 1929. Esta se utiliza corrientemente, desde hace algún tiempo, en París, por Levaditi. Igualmente fué enviada a Demole (Basilea, Suiza) y a los Institutos Pasteur, de París, y Lila, así como a Orskov, del Instituto Sueroterápico del Estado, en Copenhague Dinamarca y a P. Bordet (Bruselas).

En principio, y en lo que concierne al agente causal de la sífilis, continuamos sosteniendo, contra la tesis de la indivisibilidad de un estado evolutivo del virus, *la de su unidad morfológica y su pluralismo funcional.*

Después de haber puesto a punto una técnica especial de examen sobre fondo negro, llamada «ultranumeración homogénea» que permite establecer, aproximadamente, el contenido mínimo de treponemas libres en una masa tisular cualquiera, hemos descubierto el «treponema pállidum» en todos los órganos específicamente infecciosos de los animales sifilizados, incluso aquellos reputados como aspiroquétidos, como el encéfalo del ratón y del hamster. Hemos demostrado la existencia, por una parte, de una relación íntima entre la virulencia y la presencia del espiroqueta, y de otra, una relación inversa entre la riqueza del producto inoculado con este germen y la duración de la incubación de las lesiones que provoca.

Nos fué imposible descubrir el período denominado preesquiroquétido, invocado por los partidarios de la forma invisible; argumentos, todos, que se pronunciaron en falso contra la hipótesis del ciclo evolutivo. Nuestra conclu-

sión fué que el agente biológico de la sífilis, mientras está en plena vitalidad, es siempre «Spirochaeta pallida», de Schaudinn, o, más propiamente, «Treponema pallidum».

A decir verdad, ninguna objeción seria se hizo a nuestra tesis. La escuela de Levaditi misma, en contra de su primera actitud, comienza a rendirse a nuestras pruebas. Todavía, últimamente, los ensayos de filtración de productos específicos frescos, no le han proporcionado sino un líquido desprovisto de poder infectante. Por nuestra parte, en lo que insistiremos más adelante, hemos podido sifilizar al conejo por medio de un solo germen específico. ¿Cómo probar que en el material sifilígeno, aunque aparentemente aspiroquétido, no existe ni un solo treponema?

Sin duda, la impregnación argéntica y, sobre todo, la técnica de Seguin, han revelado, en numerosos productos sifilíticos, la presencia de gránulos, provistos de un fino filamento, que aparecerían en el curso de la división anisotípica; es decir, desigual, de la mayoría de los espiroquetas. Manouelian ve en estos gránulos el aspecto de un estado evolutivo, y como él piensa que la forma ordinaria del parásito constituye una derivación de él, propone designarle con el nombre de «espiroquetógeno». Según Simon y Mollinedo, el espiroquetógeno se encuentra constantemente y de un modo prematuro en el enfermo, persistiendo a pesar de una terapéutica intensiva. Se le ha visto en la serosidad de los gánglios primarios antes de la positividad de las reacciones humorales, así como en ciertas lesiones secundarias y terciarias. Su comprobación equivaldría al establecimiento de un diagnóstico cierto, lo que sería muy importante en los casos en los que la clínica y la serología no condujesen a ninguna conclusión; por ejemplo, al principio de la sífilis sin chancro y en el terciarismo. La teoría del espiroquetógeno viene, asimismo, a encontrar un apoyo en la evidenciación, por el microscopio electrónico, de corpúsculos densos, sesiles o no, situados a lo largo de ciertos treponemas, particularmente cerca de sus extremidades, y que se tiende a considerar como elementos de reproducción asexuada. La investigación del espiroquetógeno es imposible sobre fondo negro. Es muy delicada y no ha entrado en el terreno de la práctica corriente. Su transformación en treponema normal queda aún como una especulación y el espiroquetógeno no es, en definitiva, sino una variante morfológica de la forma filamentosa. Su realidad no prueba nada en favor de un estado invisible.

El pluralismo funcional del treponema pálido no ha sido tampoco derrocado; por el contrario, como hemos establecido, su poder patógeno se modifica en el curso de la evolución de la sífilis experimental. La variedad que se multiplica durante la incubación, al igual que las variedades sifilomatosas, ganglionar, esplénica y encefálica, tienen umbrales infecciosos diferentes. La que en particular se instala en el sistema linfático es más virulenta que la que pulula en las lesiones testiculares del conejo y es igualmente más vital puesto

que está más tiempo movible «in vitro» y resiste más «in vivo» a la acción virulicida del fenómeno de Arthus, de la hipertermia local y de la quimioterapia. Por el contrario, y no obstante, la inoculación inmediata al conejo y al cobayo de un fragmento de cerebro, recogido durante la vida, mediante trepanación, de un paralítico general, muy rico en treponemas activos, no hemos podido demostrar la infecciosidad del germen de la neurosífilis, como si éste constituyese un adaptado biológico que hubiese perdido enteramente su agresividad primitiva.

En el mismo orden de ideas y según ciertos experimentadores como Levaditi, la actividad patógena del treponema pálido varía según la fase de la enfermedad durante la que se le recoge; y en el ratón las diferentes cepas manifiestan una gran diversidad de poder dispersivo. Según Hoffmann, el espiroqueta, traído de América por la tripulación de Cristóbal Colón, no sería el de Schaudinn, sino el del pian, el cual, por un fenómeno de mutación, por contacto con un terreno nuevo, se transformaría en espiroqueta sifilítico. Hudson admite otras variedades funcionales del treponema pálido. No solamente el pian y la sífilis, dice él, sino numerosas afecciones no venéreas similares al pian, como el «bejel» y las «caratés», no serían sino modalidades de un mismo treponema original cuya división en variedades no debería basarse sobre la etiología microbiana sino más bien sobre su carácter sexual o no, así como sobre la influencia modificadora del medio. En resumen, asistimos en nuestros días a mejorías progresivas interrumpidas por exacerbaciones pasajeras de la sintomatología sifilítica humana, particularmente en razón de la variabilidad de las circunstancias geográficas y sociales y de los ataques más o menos continuados dirigidos contra la enfermedad.

La *virulencia unitaria del treponema pálido* está, también, sujeta a notables fluctuaciones. Si nos hemos servido para reconocerlas de la «microforge» y del micromanipulador neumático, inventados por Fonbrune, es porque, mediante este maravilloso instrumento, hemos comprobado que se puede obtener un sub-cultivo leptospiriano resembrando uno solo de sus elementos filamentosos o gránulos, del mismo modo que es posible transmitir la leptospirosis por medio de un único leptospira o de un único gránulo leptospiriano; como se puede, también, transmitir la tripanosomiasis por medio de un solo tripanosoma. Sin detenernos en detalles, señalemos que ningún desenvolvimiento se produjo con uno a cien treponemas de cultivo, pretendidamente sifilíticos, ni con un gran número de gránulos que les acompaña y que ninguna infección se pudo realizar con una fuerte cantidad de gránulos de emulsiones virulentas de productos sifilíticos treponemíferos. Frecuentemente, por el contrario, se lograron sifilizaciones con 10, 5, 2 y hasta con un solo espiroqueta de estas emulsiones, siendo así que numerosos fracasos se registraron con 100 y hasta 200 ejemplares frescos, perfectamente constituídos y movibles. La incubación resultó más larga con la reducción del número de

los treponemas inoculados. Pero esto no es más que una confirmación de un hecho ya conocido.

Podría imaginarse que la diversidad de los resultados obtenidos con estas inoculaciones de treponemas pálidos dependiese de las variabilidades de receptividad individual en los animales. Pero sería extraño (puesto que los ensayos fueron múltiples) que los sujetos sensibles se hubiesen encontrado en mayoría precisamente entre aquellos que no recibieron apenas especies treponémicas y que muchos de los que los recibieron en cantidad fuesen refractarios. Es más lógico admitir que la influencia del huésped fué mínima y que dos hechos esenciales se desprenden de nuestras experiencias. Primeramente, y por oposición a los gránulos leptospirianos, que se presentan como concentrados de sustancia vital y poseen en las especies patógenas toda la virulencia de la forma vegetativa, los gránulos libres de los treponemas al igual que los de los tripanosomas parecen privados de virtud reproductora y de infecciosidad específica. En segundo lugar, en los treponemas (hemos comprobado lo mismo en los tripanosomas y tal vez se trate de una ley microbiana general), la virulencia no parece uniformemente repartida entre todos los gérmenes de una misma cepa. Al lado de ejemplares que no tienen suficiente virulencia o están prácticamente desprovistos de ella, hay otros que, tomados aisladamente, llevan una carga suficiente. Esto quiere decir que el peligro de las dosis fuertes se explicaría en cuanto a los parásitos, no solamente por la masividad del ataque, sino, más bien, por la presencia entre aquellos, por lo menos, de un solo individuo morbígeno.

Un problema más práctico, pero siempre espinoso, es el de los *portadores de gérmenes sifilíticos*. En el conejo infectado artificialmente, tenga o no lesiones, sucede, a veces, como hemos establecido por la inoculación de animales nuevos, que el esperma encierra el agente causal bajo una forma virulenta. Albrecht ha demostrado suficientemente que los conejos afectados de sífilis inaparente pueden contaminar por el coito. Solamente no se ha observado nunca nada parecido en los animales perfectamente sanos. En clínica, igualmente, se ha dicho con frecuencia que el sifilítico aparentemente indemne, pero teniendo una serología positiva, puede infectar a otros. Además, y aunque por nuestra parte jamás hayamos visto transmisión por enfermos suficientemente tratados, las contaminaciones por sifilíticos sin lesiones y de serología negativa, fueron referidas a menudo. Sin embargo, estos múltiples casos caen fuera del objeto que nos ocupa y queda por probar que la sífilis se contraiga o se pueda contraer por el contacto con portadores verdaderos. En efecto, entendemos por portadores, conforme al sentido clásico, los sujetos que, sin estar manifiesta u ocultamente atacados, ni en incubación, en latencia o en convalecencia del mal, albergan el espiroqueta etiológico, especialmente en la superficie de su revestimiento cutáneo-mucoso. A este propósito, he aquí la historia de tres de nuestros pacientes.

Se trata, en primer lugar, de una mujer de cuarenta y cinco años, viviendo maritalmente con un hombre sano y no tratado, en el que el Wassermann se revela, accidentalmente, positivo. Ningún signo específico en la concubina, ni actual ni pasado. Wassermann, Meinicke y Citocol, negativos, en cuatro tomas, en el espacio de un mes. No obstante, acusación explícita de haber sifilizado cinco semanas antes del primer análisis a un amante de paso en el que el chancro aparece dieciseis días después de las relaciones.

Otro caso lo constituye una prostituta de treinta y dos años, la que, a pesar de cinco tomas sanguíneas espaciadas con quince días, en varios meses, en el curso de tres años de control médico bisemanal con cuatro estancias en el hospital, no muestra nada anormal absolutamente. Sin embargo, es tachada como contaminadora de un hombre, algunos días antes de mostrarse negativo su Wassermann por última vez.

El tercer caso lo constituye una prostituta de la misma edad, en la cual, durante tres años y cuatro meses, no se descubre jamás el menor síntoma clínico sospechoso con ocasión de exámenes bisemanales de control y cinco hospitalizaciones. Durante todo este tiempo, siete tomas de sangre, regularmente espaciadas, proporcionan Wassermann, Meinicke y Citocol negativos. No obstante, tres veces, durante el mismo período y con intervalos de cuatro y catorce meses, acusación formal de haber conferido la sífilis.

En ninguno de estos casos hubo lugar de poner en duda la buena fe de las víctimas. En el tercer caso los tres hombres no tenían relación entre sí y en el primer caso los datos del coito incriminado y de la aparición del chancro estaban en armonía. La existencia de la enfermedad en las contaminadoras no parece admisible. Igualmente no puede suponerse que la primera de las tres mujeres tuviese la enfermedad en incubación en el momento en que ella infectó, pues una observación de varios meses de posterioridad no descubrió nada patológico. Por el contrario, la hipótesis que hemos establecido de verdaderos portadores de gérmenes es tanto más plausible cuanto que las prostitutas están muy expuestas al encuentro del treponema pálido y que nada se opone, como en nuestro primer caso, a que el esperma del concubino encerrase espiroquetas virulentos. Muchos autores, como es sabido, por el examen sobre fondo negro, por la impregnación argéntica y, también, por la inoculación, revelaron la posibilidad de la existencia del agente específico en el líquido seminal, no solamente de sifilíticos latentes aún con Wassermann negativo, sino en el de los paralíticos generales.

Hemos recogido con speculum la mucosidad del líquido de lavado y la serosidad del cuello uterino de cada una de nuestras contaminadoras, alrededor de dos a seis meses después de la aparición del chancro en las víctimas. Pero la microscopia directa y varias inoculaciones al conejo y al ratón, seguida, en momentos adecuados, en la transferencia de los gánglios a conejos nuevos, no proporcionaron sino resultados negativos. Las vías genitales de nuestras

examinadas parecen, pues, haberse desembarazado del virus, lo más tarde, de uno a dos meses después del coito infectante.

Como continuación a la publicación de estos casos, otros dos nos fueron comunicados por un colega. He aquí cómo los relata:

Señora X, treinta años en 1943, de una moralidad irreprochable. El marido es atacado en julio de 1943 de chancros primarios múltiples. Aunque portador de lesiones, tiene varias relaciones con su mujer antes de consultar. Cuando se presenta se le encuentran signos discretos de roseola, una plaquita sospechosa en la garganta y un Wassermann fuertemente positivo. Desde entonces, la esposa fué examinada en varias ocasiones y jamás ha mostrado la menor lesión específica. Todas sus reacciones de Wassermann y Kahn han permanecido negativas.

Señora Y, veintisiete años en 1943. El marido tiene un chancro primario con Wassermann fuertemente positivo en noviembre de 1943. Después tiene varias relaciones con su mujer antes de ver al médico. En ella, y en varias ocasiones, el examen clínico y la serología resultan negativos. Además, en marzo de 1944, da a luz un niño perfectamente constituído, sin el menor síntoma de heredo-sífilis y con serología negativa.

En estos dos casos, dice muy juiciosamente el autor, no se ven más que dos explicaciones posibles: O bien no hay ninguna contaminación de las esposas por el hecho de una integridad absoluta de sus mucosas genitales, cosa poco probable después de varias relaciones, o bien las dos mujeres presentaban una inmunidad natural. Lo que realza el interés del segundo caso es que, en diciembre de 1943, se hizo tratar un señor Z, portador de un chancro primario con Wassermann positivo; enfermo que afirmaba no haber tenido desde septiembre de 1943 más que una sola relación sexual, y ésta con la señora Y, la que, por otra parte, lo declaró.

En resumen, nos parece que estas diversas observaciones hablan muy en favor del saprofitismo verdadero del espiroqueta de Schaudinn en ciertas mujeres que, estando completamente sanas, clínica y serológicamente, juegan el papel de vectoras del virus entre un sujeto enfermo y un cliente posterior.

Apuntemos que, si en razón de los cuidados de higiene a los cuales se sujetan habitualmente las prostitutas, esta contagiosidad no afecta apenas en la práctica a la profilaxis social, ni aún al amante ocasional, el riesgo es mayor para el ser que ha de pasar por las vías genitales y que constituye el producto de la concepción.

Pero si existen personas que sifilizan sin estar afactadas, hay también, en consonancia con estos casos, harto paradójicos, *ciertos individuos no infectados, es decir, desprovistos de premunición, que pueden exponerse impunemente a los contagios más virulentos.*

Actualmente, por ejemplo, tenemos en observación un hombre cuya esposa fué contaminada de sífilis por una relación extra-conyugal y con la cual

él mismo tiene frecuentes relaciones sexuales, sin preocuparse de las abundantes sifílides genitales ricas en treponemas de las que ella está afectada. Este hombre, jamás ha tenido sífilis anteriormente. Además, continúa perfectamente sano y su serología, invariablemente negativa. ¿Hay que admitir que en él, al igual que en las portadores de gérmenes, la superficie cutáneo-mucosa goza de una inmunidad local natural, o se trata, en uno y otro caso, de personas cuyos humores están dotados de una virtud treponemicida análoga a la que se encuentra en ciertas especies animales refractarias? La cuestión queda en suspenso. En espera de dilucidarla, persuadámonos, una vez más, de la complejidad de ciertos problemas biológicos, los más sencillos en apariencia, y repitamos lo que Nonne decía, con un poco de humor, refiriéndose a la viruela: «Oh, esfinge ¿cuándo descubrirás al fin todos tus secretos?»

Pasando a otro tema, es sabido que es larga la lista de los *animales receptivos a la sífilis*. Hay que señalar, en primer lugar, entre ellos, el mono, el conejo, el cobayo, la rata blanca y el ratón blanco. Algunos afirman que han podido sifilizar al perro, al macho cabrío y a la cabra, al cerdo, al caballo y a los bóvidos. Lo cierto es que las queratitis específicas fueron obtenidas en el gato jóven y en el lirón común. La sífilis inaparente fué también observada en este último roedor, el hamster rayado de China, el lirón del Tirol, el ratón doméstico, el ratón campesino, el Miopotame, la marmota de Europa y el Muscardin. Hemos podido nosotros mismos enriquecer esta pléyade con la sífilis asintomática del hamster dorado de Siria, de la rata grande y del erizo. Hemos provocado en el ratón blanco una manifestación chancrosa transmisible en serie. Hemos demostrado la sifilización oculta del macaco y del gato joven. En nuestro Instituto fueron observadas lesiones excepcionales en el conejo y en el cobayo. La invasión del neuro-eje fué confirmada en el conejo y en el ratón y descubierta en el hamster dorado. Pero en parte alguna ha sido comprobada una verdadera neurosífilis en el animal.

Recordemos, en esta ocasión, que el germen de la enfermedad de Bayle nunca fué aislado. El treponema, en particular, que se multiplicó en el conejo cuando Levaditi y Marie le inyectaron sangre de paralíticos generales, no era el «virus neurotropo» anunciado por los autores, sino que simplemente surgió, por casualidad, como una sorpresa de la naturaleza, el agente causal de la espiroquetosis espontánea: un treponema—aparte su avirulencia para el hombre—muy parecido al «Treponema pallidum» y para el cual, en atención a esto, hemos propuesto el nombre de «Treponema pallidoides».

Señalemos, igualmente, en lo que concierne al lirón, a la marmota de Europa, al muscardin y, según nuestras observaciones, al hamster común, al hamster dorado y al erizo, en los que la *invernada natural*, y aún el *letargo* durante algunos días en la nevera, hacen desaparecer radicalmente la infección sifilítica, que, de lo contrario, perdura en estas especies durante la vida entera. Esta extraña esterilización, bajo el único efecto del sueño, no parece

debida a la hipotermia; es decir, a la sola acción del frío sobre el virus, puesto que, según Jahnel, los espiroquetas de la sífilis conservan su vitalidad y su virulencia durante quince días, por lo menos, en el nitrógeno líquido a —196° C y durante alrededor de unas dos horas y media en las proximidades del cero absoluto, incluso en el helio líquido, a —271° C. ¿Se producirá en los animales invernantes, durante su sueño invernal, una sustancia treponemicida hormonal de la que la terapéutica antisifilítica pueda beneficiarse algún día? Esto constituye un misterio que sería interesante penetrar.

También hemos dirigido nuestra atención a la *virulencia de la sangre en la infección sifilítica* y hemos tenido que recurrir, para estudiarla, a la inoculación en el testículo del conejo. Otros, también, se han dedicado a esta tarea. Algunos han vuelto a buscar el germen con la microscopía directa. Ahora bien, basándonos en el conjunto de este experimento, lo mismo que en los accidentes de la transfusión sanguínea en clínica, podemos afirmar lo que sigue:

La sangre puede ser específicamente infecciosa en la sífilis del mono y del lirón y en dosis débiles de 1/10 a 2 c. c. en la sífilis del cobayo, de la rata blanca, del ratón blanco y del hamster dorado. En el conejo sifilizado, en el cual fué encontrado el treponema en estado libre en el plasma, puede descubrírsele a partir del quinto minuto después del injerto intratesticular, lo que prueba, dada la invasión más lenta de los gánglios más próximos, que la diseminación se hace por vía sanguínea más rápidamente que por vía linfática. Siempre, en el conejo sifilítico el parásito suele estar presente en la sangre durante la incubación y durante la floración de las lesiones. La infecciosidad vuelve a encontrarse en la sangre de la placenta. Su frecuencia disminuye con la involución de los síntomas. Desaparecidos éstos, llega a hacerse rara, pero todavía puede existir en el estadio inaparente más tardío. El mínimo requerido para la transmisión del proceso, no suele ser, generalmente, sino de 1/20 de c. c. A veces es mucho menor.

En el hombre sifilítico la infecciosidad de la sangre total y también de ciertos de sus constituyentes, como el suero y los leucocitos, es función, ante todo, de la data de la afección y de la masa inoculada. Depende, igualmente, de la presencia de lesiones treponemíferas, del tratamiento y del signo de las reacciones serológicas. Se aproxima, desde todos estos puntos de vista, a lo que ocurre en el conejo. En el hombre, más especialmente, la virulencia sanguínea es muy frecuente durante los períodos prehumoral, chancroso y secundario. Muy extendida en la sífilis latente es más que extremadamente rara en el curso del terciarismo. Parece desaparecer en la neurosífilis, pero no en la sífilis congénita tardía.

La infecciosidad parece ligada a la penetración de 1/50 a 1/10 de c. c. de sangre, por lo menos. El tratamiento por los anticoagulantes habituales apenas influye. La infecciosidad no se manifiesta infaliblemente en ningún estadio, con un c. c., pero, por otra parte, la poca cantidad de sangre que basta

a veces, muestra hasta qué punto pueden constituir infecciones masivas las transfusiones. Sin duda, si es instituída una cura adecuada y si la serología es negativa, la situación es mucho menos peligrosa que en los casos inversos; sin embargo, la realización de las condiciones óptimas no garantiza la inocuidad. Esta conclusión no está en contradicción con el hecho de que los cirujanos y tocólogos no se sifilicen, que se sepa, casi nunca, en el curso de sus intervenciones. Lo que importa, en efecto, no es la cantidad de sangre extendida sobre una piel intacta, sino la que se reabsorbe.

Y puesto que estamos tratando de la infecciosidad de la sangre de los sifilíticos, veamos lo que puede hacerse *para evitar las sifilizaciones* por las transfusiones.

Es, sin duda, inútil repetir que este accidente no es raro. Hemos leído en la literatura médica la descripción de 44 casos.

Conocemos, por lo menos, otros 25 que no fueron más que señalados, y es más que probable que estos números queden muy por debajo de la realidad. Todos los casos—insistimos de intento—surgieron con sangre o suero de los períodos prechancrosos, prehumoral, primario, secundario o latente; ninguno con sangre de terciarios o de neurosifilíticos. Aunque menos frecuentes, algunos se produjeron con sangre de sujetos tratados, a veces hasta de sujetos clínica y serológicamente indemnes.

De ordinario, se controlan preventivamente las reacciones humorales del donante, pero acabamos de ver que esta precaución, por excelente que sea, no aleja todo peligro. Hemos visto que la adición de un anticoagulante no tiene un efecto útil. Podría recurrirse, ventajosamente, al calentamiento, pero su aplicación no es cómoda y no se está seguros de no alterar las propiedades terapéuticas. Si es verdad que la influencia del frío y, sobre todo, de temperaturas muy bajas no es desfavorable al virus, la temperatura ordinaria, por el contrario, le mata mucho más de prisa. Sin embargo, no es siempre tan frágil como tiende a creérsele y sucede que hay que esperar tres días para que pierda su poder patógeno en los medios usuales. Hemos comprobado, por otra parte, el procedimiento en boga que consiste en la conservación de la sangre en la nevera después de haberla hecho incoagulable. La virulencia no se evidenció pasadas cuarenta y ocho horas, pero se acusaba con mucha regularidad, todavía, después de veinticuatro horas y hasta, excepcionalmente, al final del segundo día.

En cuanto a la adición de un espiroqueticida, Mc Cluskie, ha aconsejado el uso de 45 centígramos de neosalvarsán, y Jaworski, el de una pequeña cantidad de cianuro de mercurio. No puede calificarse de arriesgada la administración, de una vez, de una cantidad tan grande de arsénico. Mutermilch ha demostrado que, para ser eficaz, hacen falta 10 miligramos de cianuro por cada 10 c. c. de sangre; es decir, una dosis tóxica para una transfusión de importancia. No hemos querido recurrir al mertiolato de mercurio, que se

preconiza como bacteriostático para el plasma citratado a razón de 1 por 10.000. Esta concentración no dificulta el desarrollo de las bacterias preexistentes. Por otra parte, el espiroqueta sifilítico difiere considerablemente de las bacterias y ha sido señalado un caso de nefritis mercurial con anuria, seguida de muerte, en una muchacha transfusionada de esta manera. Felizmente, hemos dado con un producto suficientemente activo y relativamente anodino: el sulfato de oxiquinoleína, conocido con el nombre de quinosol o sunoxol. Conocíamos sus propiedades desinfectantes y su poder tripanocida, como también su débil toxicidad para la rata y el cobayo. Llegamos a la conclusión de que, mediante la adición de uno por mil de quinosol a la sangre citratada, se consigue frecuentemente, después de diez minutos, y, siempre, al cabo de veinte minutos, a la temperatura ordinaria, privarla de la posibilidad de conferir la sífilis. La tolerancia humana fué también experimentada respecto de este producto. Seis mujeres atacadas de anemia soportaron, sin accidente alguno, 300 a 500 c. c. de una mezcla de 50 partes de sangre citratada y de una parte de una solución, sometida a la acción del autoclave, de quinosol al 5 por 100. Actualmente, ensayamos otras sustancias treponemicidas, pero aún no podemos pronunciarnos sobre su valor.

Desde el punto de vista del *sero-diagnóstico de la sífilis* hemos de destacar una nueva prueba muy poco conocida, la «F. R. C.», así llamada por ser las iniciales de Ford Robertson y Colquhoun, que la propugnaron, en Glasgow, poco antes de la última guerra. Constituye un notable perfeccionamiento de la «Meinicke's Klärungsreaktion» núm. 2. La hemos aplicado al examen de un gran número de sueros de conejo y humanos. La técnica es muy sencilla y los resultados son de una gran nitidez. La «F. R. C.» no responde a las exigencias de la sífilis experimental, como acontece con las demás pruebas floculantes. En clínica humana su especifidad es muy estricta, por lo que está destinada a ocupar un lugar de primer rango al lado de las pruebas que utilizan la hemolisis.

Hemos comprobado la eficacia y precisado la posología de la bismutoprevención, dando la preferencia al sub-galato de bismuto, porque su «período divisionario», como dice Yernaux, es decir, el tiempo necesario para que la mitad sea eliminada, es de cincuenta y seis días y, por consiguiente, conviene, particularmente, para una protección de larga duración.

Sobre la base de dosis semanales de 1,25 a 5 miligramos de Bi-metal por kilogramo de animal, cinco series de conejos recibieron, como tratamiento inicial, 5 dosis dobles con tres o cuatro días de intervalo, y como tratamiento de sostén, a partir de la sexta semana, una dosis doble cada quince días o una dosis cuádruple cada mes. A partir de la séptima semana, se hicieron, mensualmente, tentativas de sifilización por escarificación corneal, en unos, y por injerto intratesticular, en otros, durante el tiempo que duraron las inyecciones de bismuto. Un año después de estas tentativas, se demostró la

eliminación, prácticamente total, del medicamento, por radiografía y por dosificación química a nivel de los antiguos depósitos. Finalmente, no siendo en los casos de aparición de lesiones específicas en el intervalo, la existencia de la sífilis se investigó transfiriendo los gánglios linfáticos y otros órganos, así como mediante una nueva inoculación de la cepa treponémica homóloga.

Ahora bien, los resultados variaron según el modo de inocular el virus. Si era intratesticularmente; es decir, por inoculación profunda y masiva, la contaminación exigía, para quedar sin efecto, una dosis semanal de bismuto metal de 3,75 miligramos por kilogramo; si era corneal, es decir, superficial y, de hecho, asaz comparable a la del hombre en las condiciones naturales, siempre se neutralizaba por una dosis semanal de 1,75 miligramos por kilogramo.

Así, por consiguiente—y esto confirma plenamente las observaciones de Sonnenberg en las prostitutas—, la administración semanal a un hombre de 60 kilos, de 10,5 centígramos de Bi-metal, no eliminándose el medicamento sino lentamente, la inyección mensual de una dosis cuádruple debe impregnarle lo bastante para que se oponga victoriosamente a la invasión por el treponema pálido que se inocula con ocasión de las relaciones sexuales. Además, como estas dosis son impunemente toleradas durante años, el método parece bueno para proteger contra la sifilización a las personas que a ella se exponen. En el dominio de la terapéutica hay que subrayar la severidad de las condiciones requeridas para que en sifiliografía experimental pueda afirmarse la desaparición del último treponema. Particularmente en el conejo, la serología no es demostrativa. Es necesario que, pasado mucho tiempo después de la terminación de la cura, den entera satisfacción los criterios de curación biológica que acabamos de citar. Dicho de otra manera, es necesario que la inoculación intratesticular en un conejo nuevo, de los gánglios linfáticos y de una emulsión de diversos órganos profundos, no produzca lesión. Hace falta que el sujeto controlado reaccione con un sifiloma si se le inocula en los testículos con la cepa homóloga. Pero ninguno de estos criterios, tomado aisladamente, merece una confianza absoluta. Solamente su acción combinada permite un juicio adecuado. De esta manera hemos examinado, por vía comparativa, *el valor de la quimioterapia y de la fisicopirexia por onda corta, independientemente o asociadas* en la sífilis precoz y tardía del conejo. He aquí las conclusiones a las que hemos llegado.

En los animales sometidos a la salvarsanoterapia sola, a la dosis que corresponde a 4 1/2 a 9 gramos de producto activo para un hombre de 60 kilos, fué obtenido un 44 por 100 de curaciones radicales; un 60 por 100 en la sífilis precoz y un 25 por 100 en la sífilis tardía. En los conejos sometidos a una cura completa de fisicopirexia sola, con tres sesiones de una hora de hipertermia general con una temperatura rectal de 42° C y con intervalos de tres a ocho días, el porcentaje medio de curación fué de 37: 54 en la sífilis precoz y 27 en

la sífilis tardía. En fin, cuando aplicamos simultáneamente las mismas dosis de salvarsán y las mismas sesiones de fisicopirexia que aisladamente no curaban sino en porcentajes mucho más débiles, éstos aumentaron en grandes proporciones hasta la obtención de la esterilización perfecta en la gran mayoría de los casos: 92 por 100 por término medio y, puntualizando, 83 por 100 en el estadio tardío y 100 por 100 en el estadio sifilomatoso inicial.

Independientemente de nosotros, en los Estados Unidos de América, Boak, Carpenter y Warren, registraron éxitos análogos, así como numerosos investigadores que aplicaron el método en el hombre. Actualmente, según una estadística que comprende millares de casos, puede decirse que en sifiliografía humana la fisicopirexia, combinada con la quimioterapia, reemplaza ventajosamente a la paludización, tal como este procedimiento obra en todos los estadios para eliminar rápida y completamente el mal.

Pero hay un último punto que debemos considerar, a saber: *el papel adjudicado a la penicilina en la lucha antisifilítica*. Ciertamente, es demasiado pronto para emitir una opinión definitiva. Sin embargo, los datos de laboratorio y de la clínica bastan para que se les agrupe en una primera impresión de conjunto. «In vitro», la acción de la penicilina fué estudiada sobre la movilidad y sobre la virulencia del treponema pálido En nuestros ensayos con penicilinas recibidas en 1945, la inmovilidad afectaba, a la totalidad de los parásitos, a las concentraciones de 50 y 500 unidades por c. c., respectivamente, después de seis y tres horas. Otros autores utilizaron cantidades mayores y algunos advirtieron que la forma cristalina G actuaba menos sobre el dinamismo de los gérmenes que las muestras parcialmente purificadas. También parece que el elemento que paraliza al espiroqueta, trátese o no de una impureza, no está presente en la misma proporción en todas las penicilinas.

La virulencia, fuera del organismo, no parece afectada más que en las dosis muy fuertes. Así es que hicieron falta 10.000 unidades, por lo menos, por c. c. y tres horas de contacto a 37° C para privar de todo poder infeccioso a una emulsión o a un fragmento de injerto treponemífero de conejo. El efecto fué el mismo sobre uno y otro material, lo que muestra que el antibiótico está dotado de un excelente poder de difusión transtisular.

En el animal, Mahoney y sus colaboradores de los Estados Unidos de América, lo mismo que Lourie y Collier en Inglaterra, fueron los primeros en señalar la influencia feliz de la penicilina sobre las espiroquetosis arsenosensibles. Sin embargo, fué, según nuestro conocimiento, en Francia y en Bélgica, donde, desde el principio, la investigación fué más activamente impulsada a este respecto.

Primeramente, hay que citar los trabajos de Levaditi y Vaisman, así como los de Gastinel y sus colaboradores. Todos observaron, con dosis diversas, resultados curativos manifiestos. No obstante, el plazo observado antes de las pruebas de curación, fué frecuentemente muy corto. Por nuestra parte,

recurrimos después de suficientes plazos, a la combinación de los tres criterios expuestos más arriba.

De esta manera se averiguó que la penicilina en la sífilis, tanto antigua como precoz, del conejo y del ratón, llega a desembarazar al organismo del virus después de seis meses y más. Para ello basta con aplicar la dosis, por lo menos de 100.000 unidades por kilogramo de peso, repartida en inyecciones intramusculares cada tres horas durante ocho días. Falta saber, como dijimos en un principio, el modo de simplificar la técnica de la administración y reducir al mínimo la masa medicamentosa, sin disminuir la eficacia. Una feliz innovación en este sentido es el uso, siguiendo el procedimiento de Romansky y Rittman, en la gonorrea, de una suspensión de penicilina en aceite de cacahuet adicionada de un 3 por 100 de cera de abejas. Los conejos que hemos tratado así, con la dosis total de 100.000 unidades por kilogramo en ocho días y aún con menos, se han restablecido enteramente, basándose en el resultado de los controles instituídos después de cuatro a siete meses. Sin embargo, no habían recibido más que dos inyecciones en veinticuatro horas. La penicilina se ha revelado capaz, introducida «per os» o por vía subcutánea con un fin preventivo, de impedir que se declare la sífilis en los animales contaminados. Por el contrario, según nuestras experiencias, dosis sub-curativas, como las que constituyen el tratamiento clásico de la blenorragia en el hombre, incluso de 1.700 a 3.000 unidades por kilogramo en 5 inyecciones, con intervalos de tres horas, no exterminaron la sífilis ni la hicieron asintomática sino que simplemente retardaron la aparición. Esto justifica la desconfianza de los prácticos con respecto a la penicilinoterapia antigonocócica. Pudiendo enmascarar una sífilis en caso de infección mixta, se impone una vigilancia prolongada del enfermo.

Por oposición a los resultados de laboratorio, que preceden, los de la sifiliografía clínica están lejos de ser perfectos, pues después de haber obtenido blanqueamientos rápidos mediante 1 a 2 millones de unidades penicilínicas y más, se vió, en el hombre, aumentar el número de recaídas a medida que se mantenía a los sujetos más tiempo bajo control. También se formularon pronto reservas respecto de la asociación de la penicilina a otras terapéuticas como la hiperpirexia, los arsenicales y, sobre todo, el bismuto.

Las tentativas de la penicilinoterapia de la neurosífilis, fueron particularmente decepcionantes, pues si bien los afectados de procesos meníngeos parecieron beneficiarse a veces, los afectados del parénquima del neuro-eje escaparon a los beneficios terapéuticos casi siempre.

De acuerdo con Neymann, suponemos que esto obedece al doble hecho de que la penicilina no se difunde apenas a través de la barrera hemato-encefálica, y si llega a forzarla no penetra lo suficiente en los focos treponémicos de la corteza gris, a causa de que ésta es esencialmente de naturaleza lipoidea y la penicilina de que se dispone hasta el presente es insoluble en las grasas.

Hemos estado preocupados mucho tiempo por las discordancias que la penicilinoterapia antisifilítica sola parece resaltar en el hombre y en el conejo. Pero últimamente hemos comprobado que, en el animal tratado con una dosis total, largamente suficiente a primera vista (100 a 150.000 unidades por kilogramo), la inoculación tardía de la cepa homóloga (después de siete a veinticuatro meses) puede continuar negativa y esto a pesar de la negatividad de los trasplantes de gánglios o de otros órganos. Hemos deducido que la curación radical no había sido alcanzada y que, en espera de otros datos, sería prudente conformarse con la experiencia de la sifiliografía clínica: preferir a la cura de penicilina sola, una cura combinada de penicilina y de otro antisifilítico, particularmente el bismuto; por ejemplo, atacar por medio de una dosis masiva del antibiótico, y luego continuar manteniendo al organismo bajo una intensa acción metálica.

TRABAJOS DE LA SECCION DE LEVADURAS DEL INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL Y APLICADA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (*)

EL NUCLEO DE LAS CELULAS DE LEVADURA

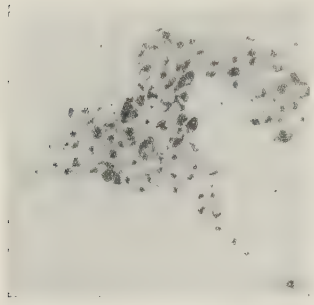
Arsenio Fraile Ovejero

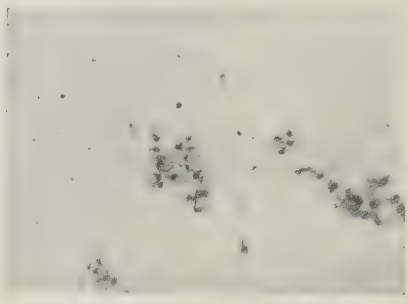
El problema del núcleo de las levaduras se nos muestra aún pródigo en hipótesis variadas a pesar de las aportaciones de gran número de investigadores que ya desde finales del pasado siglo han dedicado su atención al estudio de la organización estructural de las células de tan interesantes microorganismos. Janssens y Leblanc (1) llamaron núcleo a lo que hoy se conoce vulgarmente como vacuola, y apreciaron un corpúsculo en íntimo contacto con él al que consideraron como nucléolo. En 1910 destacan dos tendencias diferentes, principalmente: por una parte, Guillermond (2) sostiene que las levaduras tienen un núcleo (el nucléolo de los autores citados antes) y una vacuola ordinaria sin relación con él; pero Wager y Peniston (3), tomando como base unos trabajos de Harper sobre la Phyllactinia, pretenden resucitar la concepción de Janssens y Leblanc, llamando ahora al núcleo de aquéllos «vacuola nuclear», en la que se encuentra un retículo de cromatina y un gránulo central de volutina. Estas formaciones vacuolares son consideradas más tarde por Guillermond (4) como granulaciones metacromáticas, al tiempo que estudia su coloración vital. No faltan en la literatura otras opiniones diferentes, y así se expone la tesis, aun hoy frecuentemente sostenida, de la no existencia de núcleo individualizado. En las obras de carácter general se suele estar de acuerdo con Guillermond respecto de la naturaleza del núcleo, y se recomienda el método de la hematoxilina férrica para colorearle, ya que es invisible sin tinción. Henrici (5), en una revisión sobre el tema,

(*) Los primeros resultados fueron conseguidos en el Laboratorio de la Sección de Microbiología del «Instituto especial de la Grasa y sus derivados».

*Microbiología Española.—Vol.*1.º 1947. *Presentado el día* 3 *de noviembre de* 1947.

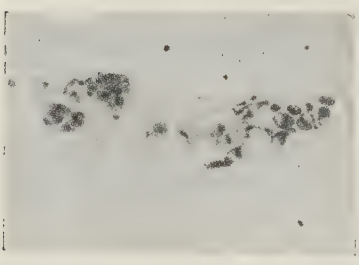
denuncia procesos de división y de conjugación de núcleos en la reproducción tanto vegetativa como sexual de la levadura. La posición que viene manteniendo Lindegren (6) es, no obstante, muy diferente. Lleva más lejos la de Wager y Peniston, anteriormente expuesta, y considera como cromosomas y cromómeros a la red vacuolar de cromatina, llama nucléolo al gránulo central de volutina de aquéllos, y lo que para Guillermond es núcleo es para

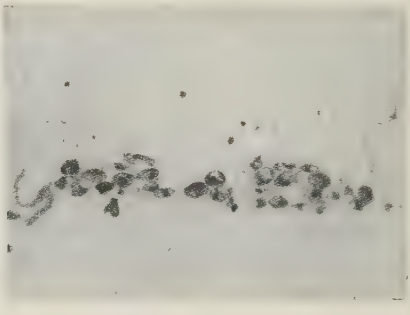




Lindegren centriolo. En favor de Guillermond hablan los trabajos de Badian, confirmados por Carson y Nagel, quienes han encontrado reacción Feulgen positiva para la estructura considerada como núcleo por dicho investigador. Parece ser que también Levene, y últimamente Naiden y Bakshi, han aportado nuevos hechos de gran interés, de los que no tenemos noticias concretas.

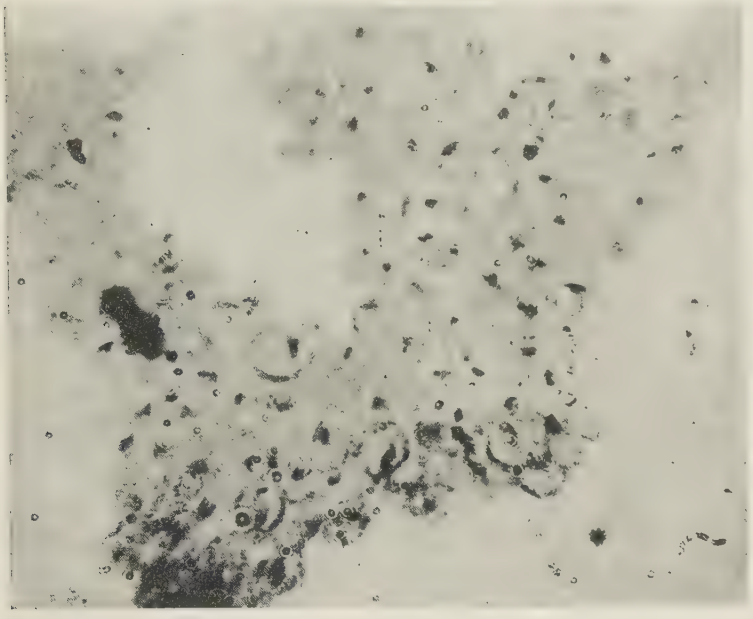
No pretendemos haber hecho, ni remotamente, una exposición completa de la evolución de las ideas sobre la materia. Pero hemos creído necesaria





esta introducción con objeto de situar cronológicamente nuestros resultados, los cuales fueron expuestos en la Sesión del 3 de noviembre de 1947 en la Sociedad de Microbiología de Madrid. Fundamentalmente, nuestro trabajo ha consistido en la aplicación al caso de las levaduras del método de coloración con que Robinow (7) puso de manifiesto el núcleo de las células bacterianas. Es sabido que el problema de la existencia de núcleo individualizado

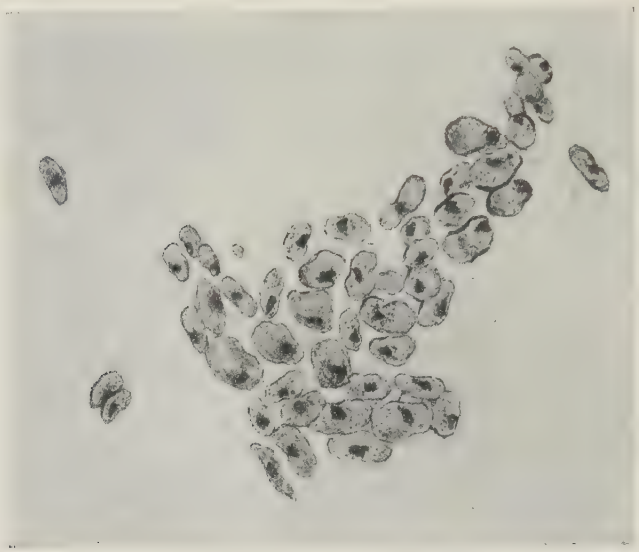
en bacterias, objeto de tantos debates, ha sido resuelto positivamente por dicho autor, cuyo método operatorio tiene por objeto extraer los ácidos ribonucleínicos de la célula mediante ClH y teñir a continuación los desoxirribonucleínicos, propios del núcleo y que no son arrastrados por el anterior tratamiento. Posteriormente, el microscopio electrónico ha confirmado sus resultados.



Nosotros hemos operado sobre una raza de Saccharomyces elipsoideus procedente de la Dansk Gaerings Industri, de Copenhague, sobre el S. Beticus, Marcilla, raza α, estirpe F_4 de la colección del Instituto de Microbiología del C. S. de Investigaciones Científicas, así como sobre otras especies de Saccharomyces y diversas Torulopsis. En todos los casos se aprecia intensamente teñido en azul oscuro un pequeño corpúsculo excéntrico, contiguo a la vacuola y perfectamente definido, que contrasta con el azul claro del citoplasma y el más débil todavía de la vacuola, tal como se puede apreciar en las microfotografías y dibujo a la cámara clara correspondientes (**). Identificamos dicho corpúsculo con el que Guillermond y Badian llaman núcleo, Wager y Peniston nucléolo y Lindegren centriolo. Una minuciosa observa-

(**) Agradecemos las primeras al Ingeniero Agrónomo Sr. Feduchy y al Comandante médico Sr. Valle, y el segundo a la Srta. Laffón.

ción descubre a veces soluciones de continuidad en la estructura nuclear así coloreada; nos ha sido posible contar en algunos casos hasta 8 unidades discretas; hemos podido sorprender figuras de división características; con mayor frecuencia aparece un doble núcleo, y aun en las gemas sólo iniciadas aparece ya el corpúsculo aludido.



El método operatorio adoptado no difiere en esencia del de Robinow: Partimos, bien de un cultivo de la levadura en medio sólido o bien de un cultivo líquido. En el primer caso, suspendemos una pequeña porción, tomada con asa de platino, en una gota de agua, sobre el portaobjetos, y dejamos secar al aire; en el segundo, extendemos y dejamos secar, simplemente. Fijamos la preparación con alcohol absoluto. Una vez evaporado el alcohol, se lleva la preparación a un recipiente que contiene ClH al 5 % y a 60° de temperatura, en donde se mantiene cinco minutos, cuidando de que dicha temperatura permanezca constante. Al cabo de este tiempo se lava abundantemente con agua al chorro de la fuente y después se tiñe durante veinte-treinta minutos con solución de azur II-eosina, según Giemsa, diluída al 2,5 %. Se lava con agua nuevamente, se seca y se observa con inmersión. En algunos casos, cuando por un imperfecto control de las condiciones operatorias aparecían las células demasiado coloreadas, nos fué posible corregir las deficiencias de la misma preparación decolorándola con ClH, con lo que las células quedan débilmente teñidas de rosa, y un nuevo tratamiento con Giemsa vuelve a colorear electivamente el corpúsculo aludido. Los primeros resultados

satisfactorios fueron conseguidos siguiendo una marcha algo diferente: después de fijada la preparación, se coloreó con Giemsa una media hora, se llevó a un recipiente con ClH al 10 % en frío y se calentó entonces hasta 60°, en lo que se tardaron unos ocho minutos; por último se recoloró con Giemsa quince minutos. De esta forma obtuvieron láminas del mayor contraste, pues ninguna otra estructura de la célula tomó el más leve color.

Todos los trabajos posteriores han sido hechos en colaboración con la Srta. Dr. Aurora Torromé, del Instituto de Microbiología.

Observamos que en algunas preparaciones aparece teñido en rojo oscuro o negruzco el contorno de algunas células y que, cuando éstas están en masas apretadas, determinan dichas formaciones un aspecto reticular, generalmente exagonal, cuyos nudos están engrosados y toda la red es claramente granulosa. Algunas células sueltas presentan parches o gránulos en la periferia que son restos del retículo. No nos atrevemos a aventurar ninguna hipótesis sobre la naturaleza de estas formaciones, no parecen ser modificaciones de la membrana determinadas por el envejecimiento de los cultivos, pues también se presentan en cultivos recientes. Acaso sea responsable alguno de los tiempos del método de coloración; así, por ejemplo, cuando el ClH actúa quince minutos o cuando sube la temperatura de 60°, las citadas estructuras son más frecuentes.

Hemos ensayado diversas modificaciones del método de tinción expuesto. Así, dejando actuar el Giemsa una o tres horas, sigue apreciándose claramente el núcleo, pero el citoplasma se colorea demasiado y el contraste es menor. En estos casos es eficaz la decoloración a la que antes nos referimos. Se consiguen buenas preparaciones cuando el previo tratamiento con ClH al 5 % se hace desde frío hasta 70°, durando ocho-diez minutos la operación. Si el ClH sólo actúa un minuto a 60° resultan las células muy uniformemente teñidas aunque el tratamiento con Giemsa sea sólo de cinco minutos. Mayor diferenciación se obtiene con ClH en frío cinco minutos, pues aparece la vacuola en azul más claro y algunos corpúsculos citoplásmicos más oscuros, si la acción del Giemsa no pasa de diez minutos. El ClH al 5 % en frío durante veinticuatro horas altera de tal forma la célula que no es posible distinguir estructura alguna. Asimismo, el tratamiento con ClH al 5 % y a 60° de temperatura, cuando pasa de diez minutos determina la total incolorabilidad del citoplasma, y si llega a quince minutos deteriora mucho las células. Con ClH al 10 % y a 60° durante ocho minutos, el Giemsa después no colorea a la célula más que en rosa pálido aunque permanezca en el colorante varias horas. Pero con ClH al 50 % en frío cinco minutos, conservando normal el resto de las operaciones, conseguimos las mejores preparaciones para el estudio de los cromosomas, si bien toda la célula aparece demasiado coloreada, lo que dificulta la buena observación. Además, se distinguen a la vez células completamente azules y otras muy débilmente teñidas.

También señalaremos que, sustituyendo el ácido por hidróxido sódico al 5 % y con el resto de las condiciones como normalmente, aparecieron los núcleos con toda perfección.

En cierta ocasión, por un descuido, no fijamos con alcohol, y ello no motivó ninguna variante en los resultados.

Por otra parte, hemos sustituído el Giemsa por azul de metileno al 0,01 %: citoplasma y vacuola en azul muy débil; núcleo más oscuro; pero nos parece necesaria una mayor concentración del colorante o más tiempo de contacto para conseguir mayor diferenciación.

Continuamos trabajando sobre estos problemas en diversas direcciones.

RESUMEN

Empleando el método de Robinow para bacterias, se identifica como núcleo de las células de levadura la estructura que Lindegren llama centriolo, Wager y Peniston y Janssens y Leblanc nucléolo, y Badian y Guillermond núcleo. Se denuncian procesos y figuras de división características. Se ensayan diversas modificaciones al método de coloración aludido. Observamos en algunas preparaciones ciertas formaciones del contorno celular que dan impresión de un tejido organizado y cuya naturaleza no es aclarada.

BIBLIOGRAFIA

(1) *La Cellule.* 14, 1898, 203.
(2) *C. R. Ac. Sc.* 150, 1910, 835.
(3) *Ann. Bot.* 24, 1910, 45.
(4) *Ann. Ferment.* V, 1939.
(5) *Bacteriol. Rev.* VI, 1941.
(6) *Mycologia.* 37, 1945, 767; *An. Missouri Bot. Garden.* 32, 1945,107; etc.
(7) *Proc. Roy. Soc. London B.* 130, 1942, Tulasne.—*C. R. Soc. Biol.* 141 (7-8), 1947, 411

Variaciones de la riqueza en ácido nicotínico de diversas levaduras, con las de los medios de cultivo y multiplicación, en aerobiosis o en anaerobiosis

NOTA PRELIMINAR (TECNICAS Y PRIMEROS RESULTADOS)

JUAN MARCILLA ARRAZOLA y PILAR AZNAR ORTIZ

Antecedentes.—El Instituto de Microbiología General y Aplicada y, anteriormente, la Sección de Fermentaciones del Instituto Cajal (hoy integrada en el citado Instituto) han venido dedicando, y siguen haciéndolo, especial atención a las investigaciones relativas a la multiplicación forzada de levaduras con destino a la alimentación del ganado y a la dietética humana. La riqueza en materias nitrogenadas complejas (vulgarmente designadas, en conjunto, como *proteínas)* y en vitaminas del grupo B constituyen los componentes más valiosos de las levaduras alimenticias y, por ello, tienen gran importancia las determinaciones que a estos dos tipos de sustancias se refieren.

Pero al analizar por métodos químicos la riqueza en ácido nicotínico de las diferentes especies y razas de *Torulopsis* que tenemos en estudio y, comparativamente, las de levaduras industriales, prensadas y de cervecería (acerca de cuya composición abundan mucho los datos en la bibliografía especial), tropezamos con discrepancias tan grandes que no podían ser achacadas a errores experimentales, ni a las técnicas analíticas, lo que nos condujo a examinar detenidamente la cuestión. Por fortuna, cuando teníamos en marcha esta experimentación previa, llegó a nuestras manos el trabajo de J. M. Van Lanen, titulado *The absorption of niacin by yeast* (1), que aclaraba, al menos para levaduras de panadería y de destilería, las causas de las faltas de concordancia observadas en nuestros análisis. El objeto de esta Nota es el de hacer públicos los primeros resultados obtenidos al tratar de confirmar el trabajo de Van Lanen, con una estirpe de *Torulopsis* por nosotros aislada y estudiada, estirpe a la que designamos, provisionalmente, como *Torulopsis liquefaciens,* aludiendo a su notable poder gelatinolitico.

Microbiología Española.—Vol. 1.º 1947. *Presentado el día* 3 *de noviembre de* 1947.

En sucesivas comunicaciones daremos cuenta de los trabajos, hoy en curso, en los que procuramos investigar más de cerca la absorción, la síntesis y la *«metabolización» del ácido nicotínico* por la citada *Torulopsis* y por las dos estirpes de *Torulopsis utilis* (Henneberg. emm. Lodder) que poseemos, así como la riqueza en este ácido lograda con estas levaduras sobre medios de cultivo sintéticos y sobre los naturales (hidrolizados de zuros o carozos de maíz, extractos acuosos y jugos de prensa de los resíduos de las industrias de los ágrios, mostos de difusión y prensada de rizomas tuberosos de Asphodelus..., etcétera) que utilizamos en nuestras investigaciones en escala semi-industrial.

Entre los resultados del trabajo de Van Lanen interesan especialmente, para las finalidades de nuestro estudio, los siguientes:

a) Las especies y razas de levaduras difieren considerablemente en lo que respecta a su facultad de tomar ácido nicotínico del medio de cultivo y de sintetizar dicho ácido en cultivos sobre distintos medios.

b) El ácido nicotínico es absorbido fuertemente durante la fermentación de los azúcares, en condiciones de anaerobiosis, pero muy pronto, cuando el azúcar fermentescible está casi agotado, las levaduras se empobrecen rápidamente en ácido nicotínico, cediendo al medio una parte y destruyendo (metabolizando) otra. Esta destrucción parece ser más intensa (al menos con levaduras de panadería) cuando la siembra de levaduras es abundante y para bajas concentraciones de azúcar en el medio de cultivo.

c) En condiciones de amplia aerobiosis, las levaduras (de panadería) absorben y sintetizan mayores proporciones de ácido nicotínico, de modo especial en las primeras horas, y esta riqueza no es cedida (o sólo en cantidad muy pequeña) al medio, ni destruída en veinticuatro horas, aunque a partir de la octava el azúcar disponible ha sido prácticamente consumido en las experiencias de Van Lanen. Existe, por tanto, una radical diferencia en las modalidades de absorción y de destrucción y cesión del ácido nicotínico según que la levadura se encuentre en condiciones de oxi o de anoxibiosis, y estas circunstancias son susceptibles de producir variaciones sumamente amplias en las cifras halladas en las determinaciones y análisis del contenido en niacina, por vía biológica o por métodos químicos.

Técnicas experimentales.—Ante la lentitud de los métodos de determinación de vitaminas por métodos biológicos, utilizando animales de laboratorio, lentitud que las hace poco adecuadas para las investigaciones en serie, trabajamos con técnicas por vía química, procurando confirmar los resultados obtenidos mediante métodos de ensayo biológico, microbianos. Para el ácido nicotínico, sin embargo, no nos ha sido posible, hasta el momento, proceder a determinaciones en serie con estas últimas técnicas, por la dificultad de disponer de algunos productos puros (*l*-cistina, *d . l* -triptófano, adenina, guanina, uracilo, *d*-pantotenato cálcico, piridoxina, ácido *p*-aminobenzoico) indispensables constituyentes de los medios basales para los ensayos según

Krehl, Strong y Elvehjem (2), o según Barton-Wright (3), técnicas por nosotros elegidas. Entre las analíticas del ácido nicotínico por vía química seguimos la descrita por Grande Covian (4), que se funda, como la mayoría de las propuestas, en la ruptura del anillo piridínico y condensación subsiguiente de la cadena con una amina aromática para dar origen a un producto coloreado susceptible de ser determinado colorimétricamente.

Grande Covian utiliza el bromuro de cianógeno y realiza la condensación con anilina recientemente destilada. Las únicas modificaciones, propias de la técnica citada, se refieren al modo de obtener los hidrolizados de la materia a estudiar (levaduras para nosotros y productos varios, alimenticios, para Grande Covian) y a la utilización, en nuestros ensayos, del fotómetro de Pulfrich-Zeiss en lugar del colorímetro fotoeléctrico de Evelyn, que Grande Covian emplea.

En ensayos previos comparamos los resultados obtenidos con hidrolisis ácida directa de las levaduras, con hidrolisis del extracto acuoso de las mismas, obtenido a una atmósfera de sobrepresión durante una hora, y con hidrolisis del extracto obtenido de levaduras adicionadas de cloruro sódico y autolizadas a 50°, 55°, lavadas finalmente con agua hirviendo.

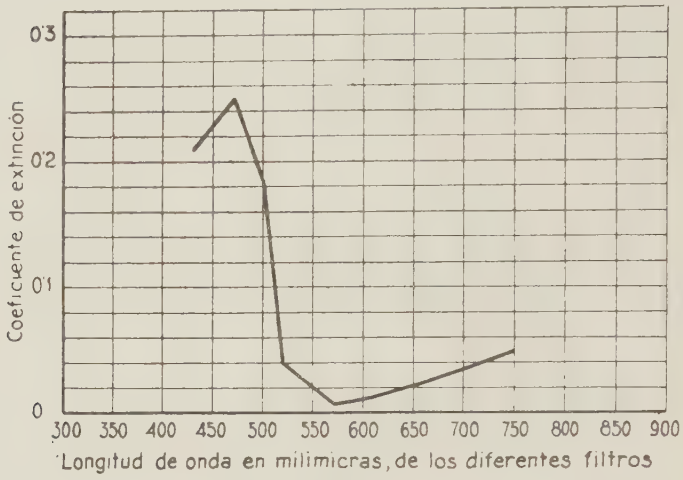
1.° *Hidrolisis ácida directa.*—A 2,5 gramos de levadura (cuya materia seca ha sido determinada exactamente) se añaden 2,5 c. c. de agua destilada y 5 c. c. de ácido clorhídrico 8 N, en un tubo de vidrio Pyrex, graduado con dos trazos que aforan 10 y 35 c. c. En la boca del tubo se pone un embudito de vidrio y la hidrolisis se realiza en baño de agua hirviente, durante una hora.

2.° *Hidrolisis del extracto acuoso.*—A 2,5 gramos de levadura (cuyo contenido en materia seca se conoce) se añaden 50 c. c. de agua destilada y la suspensión es llevada al autoclave, en el que permanece durante treinta minutos a una atmósfera de sobrepresión. Después de enfriar se separa el resíduo sólido por centrifugación. Este resíduo es lavado con 25 c. c. de agua destilada, hirviendo, centrifugando de nuevo y reuniendo el agua de lavado con el primer extracto. Se repite una vez más la última operación y el extracto y los lavados se evaporan al baño maría hasta casi sequedad. Con ayuda de 5 c. c. de ClH . 8N y agua, se transvasa el concentrado al tubo Pyrex, citado más arriba, completando con agua hasta el trazo de 10 c. c., terminando la hidrolisis como en el caso anterior.

3.° *Hidrolisis del extracto obtenido por autolisis y lavados* —Una mezcla de 2,5 gramos de levadura fresca (materia seca previamente determinada) y Cl Na en proporción de un 12 % del peso de la levadura, se llevan a estufa a 50°-55° de temperatura, durante tres horas. Se lava reiteradamente con agua hirviendo (centrifugando cada vez para separar el resíduo sólido), hasta completar un volumen de 50 c. c. de extractos, que se hidrolizan con ClH . 8N, después de concentrar al baño maría, como en el proceso anterior.

También previamente, elegimos el filtro más adecuado para las colorimetrías con el fotómetro Pulfrich-Zeiss, ensayando los filtros S-43, S-47, S-50, S-53, S-57, S-61, S-66, S-72 y S-75. El filtro más conveniente es el S-47, según se demuestra en la *gráfica I* (fig. 1.ª).

GRAFICA I


0'3
0'2
0'1
0
Coeficiente de extinción
300 350 400 450 500 550 600 650 700 750 800 850 900
Longitud de onda en milimicras, de los diferentes filtros

Por último, se comprueba el cumplimiento de la ley de Beer, realizando colorimetrías con soluciones de ácido nicotínico puro, cuyas concentraciones varían de 2 en 2 γ, desde 2 a 20 γ. La *gráfica II* (fig. 2.ª) demuestra el satisfactorio ajuste de la recta obtenida, entre estos límites de concentración.

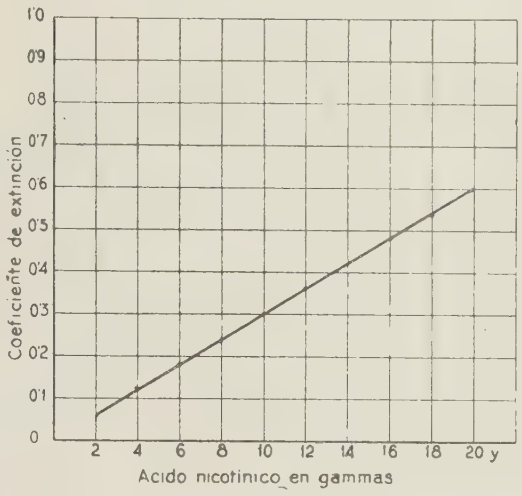
Siguiendo la técnica de Grande Covian, la decoloración de los hidrolizados, antes de su análisis colorimétrico, la realizamos con hidróxido de zinc, precipitado al añadir sulfato de zinc y una lejía alcalina a los líquidos que se ensayan, y completando, *si es necesario*, la decoloración con carbón vegetal decolorante (utilizamos siempre el «*Carbón activo seco para análisis*» *de Merck*).

Para líquidos muy débilmente coloreados después del tratamiento con hidróxido de zinc, y sin necesidad de adición de carbón decolorante, se puede corregir el error, determinando el coeficiente de extinción debido al color residual del hidrolizado, mezclando 3 c. c. del mismo con 7 c. c. de solución amortiguadora, alcohólica, de fosfato (1.960 c. c. de agua destilada + 10 c. c. de ácido fosfórico siruposo, 85 % + 30 c. c. de Na O H al 15 % + 333 c. c. de alcohol absoluto), comparativamente con una solución en blanco, formada por 2 c. c. de agua destilada + 1 c. c. de alcohol absoluto + 7 c. c. de la solución alcohólica, amortiguadora, arriba citada.

Los extractos acuoso y de levadura autolizada quedan completamente incoloros después del tratamiento con sulfato de zinc y sosa.

En todos los casos, antes de la colorimetría se ajusta a pH = 7 (el error es sensible fuera de los límites de pH = 6,8-7,2).

GRAFICA II



Ciertos componentes de los extractos pueden ejercer alguna influencia en el desarrollo de la coloración y, por ello, es aconsejable operar según Melniek y Field, añadiendo a una alícuota del líquido que se analiza una proporción exactamente conocida de ácido nicotínico para determinar así el valor del coeficiente de extinción debido al derivado coloreado procedente del ácido nicotínico, *en cada caso particular*.

En los ensayos para elección del método de hidrolisis de las levaduras hallamos, como medias, los siguientes resultados:

Levadura	Extracto	Hidrolisis	Miligramos de ac. nicotínico en 100 grs. de levadura seca a 100°
Prensada.....	Acuoso.....	Acida.....	28,6
»	De levadura autolizada.....	Idem.....	28,6
»		Directa, ácida.....	28,3

Las cifras obtenidas son sensiblemente concordantes, por lo cual trabajamos casi siempre por el método de hidrolisis directa, corrigiendo la obte-

nida para el coeficiente de extinción mediante el ensayo, antes descrito, con el líquido de cada muestra, sin reactivo, y solución amortiguadora, alcohólica, de fosfato.

Comprobamos también que no ejerce influencia alguna, perturbadora, la pequeña adición de «*Carbon activo seco para análisis*, de Merck, que puede ser necesaria para completar la decoloración.

Para comodidad del lector que desee reiterar nuestros ensayos, detallamos a continuación la marcha de la técnica que seguimos, aunque en ella no existe novedad alguna, fuera de las pequeñas modificaciones que quedan apuntadas.

Se prepara la solución de bromuro de cianógeno tratando agua de bromo (saturada a 5°-10° de temperatura) por solución al 10 % de C N K, hasta decoloración.

La solución de anilina, al 4 %, en alcohol absoluto se preparará a partir de anilina recientemente bidestilada, incolora. Esta solución se conserva bien durante una semana, en frasco bien tapado.

En tubos de vidrio Pyrex, aforados con dos trazos a 10 c. c. y 35 c. c., se ponen 2,5 grs. de levadura (cuyo contenido en materia seca ha sido previamente determinado) y se procede a la hidrolisis por cualquiera de los métodos descritos. Después de enfriar se añaden 2 c. c. de solución de sulfato de zinc al 80 %. Mezclar bien y adicionar 5 c. c. de Na O H . 4 N, teniendo cuidado de que la temperatura no se eleve (mantener entre hielo). Adicionar otros 5 c. c. de Na O H . 4 N, y ajustar, si es preciso, a pH = 7. Completar con agua destilada hasta 35 c. c. Centrifugar durante quince minutos a 4.000 revoluciones, decantando el líquido claro.

Una alícuota de 15 c. c. de este líquido se lleva a un Erlenmeyer de 100 c. c. Añadir 15 c. c. de ClH . 4 N, en alcohol absoluto. Tratar con carbón activado seco para análisis, de Merck (no más de 100 miligramos). Esperar, agitando, diez minutos y filtrar por filtro rápido o centrifugar.

Se toman 20 c. c. del filtrado y se neutraliza con 5 c. c. de Na O H . 8 N, y si es preciso se ajusta con Na O H . N/1 ó con Cl H . N/1 hasta pH = 7 Se añaden 5 c. c. de alcohol absoluto.

Se preparan líquidos testigo, en blanco, en pequeños tubos de ensayo, mezclando 2 c. c. de agua destilada con 1 c. c. de alcohol absoluto, agitando y añadiendo 6 c. c. de solución reciente de bromuro de cianógeno; se mezcla bien y se adiciona 1 c. c. de solución al 4 %, en alcohol absoluto, de anilina recientemente bidestilada. Agitar con varilla de vidrio.

En un segundo tubo se ponen 3 c. c. de la muestra que analizamos + 0,1 c. c. de alcohol absoluto + 6 c. c. de solución reciente de bromuro de cianógeno. Mezclar bien y añadir 1 c. c. de la solución alcohólica de anilina. Agitar con varilla de vidrio. A los cinco minutos se llevan los líquidos de muestra y testigo a las cubas del fotómetro, de tamaño convenientemente elegido para que la extinción esté comprendida entre 0,3 y 0,6 y se realiza la medida con filtro S-47.

En un tercer tubo se ponen 3 c. c. de la solución muestra a la que se añaden 0,1 c. c. de solución alcohólica de ácido nicotínico que contiene 10 miligramos de dicho ácido en 100 c. c. Mezclar bien y añadir 6 c. c. de bromuro de cianógeno. Agitar con varilla y adicionar 1 c. c. de la solución alcohólica de anilina. A los cinco minutos realizar la observación en el fotómetro, utilizando en la segunda cuba los líquidos testigos, en blanco, citados más arriba.

Calculados los coeficientes de extinción de estos líquidos (extinción por una capa de líquido de un centrímetro de espesor) y (en caso de duda sobre la decoloración completa de la muestra de hidrolizado) el de una segunda prueba en blanco, con el líquido a analizar y solución alcohólica, amortiguadora, de fosfatos, se realizan los sencillos cálculos precisos para obtener la riqueza de las levaduras en ácido nicotínico, expresándola en relación con la materia seca de las mismas.

Resultados de las primeras experiencias.—Comenzamos por determinar la riqueza en ácido nicotínico de varias muestras de levadura, procedente de

una fábrica de cervezas de Madrid. Estas muestras son prensadas en el laboratorio, en el que se conservaron en frigorífico hasta su análisis.

	Miligramos de ácido nicotínico en 100 grs. de materia seca
1.ª muestra. Levaduras de cervecería.....	37
2.ª » » » »	37
3.ª » » » »	40,4
4.ª » » » »	30

Las cifras son todas bastante más bajas que las que se consideran normales, utilizando técnicas iguales o análogas (hidrolisis ácida) a la que seguimos. Las obtenidas después de hidrolisis alcalina son a veces más elevadas y no concuerdan con las determinaciones de ácido nicotínico por vía biológica, cuando la materia que se analiza contiene trigonelina.

Suponiendo que la conservación en frigorífico, aunque sea por el breve plazo (algunos días), durante el cual fueron conservadas las anteriores muestras, puede causar sensible pérdida de ácido nicotínico, determinamos la riqueza en este ácido de una levadura de idéntica procedencia, procediendo sin demora al análisis de la traída de la fábrica. El resultado es:

	Miligramos de ácido nicotínico en 100 grs. de materia seca
5.ª muestra. Levadura de cervecería.....	53

Cifra concordante con las obtenidas por Fink y Just (5). (52,2-52,5-53,9 y 50,3 miligramos de ácido nicotínico por cada 100 miligramos de materia seca de levaduras de cervecería) a pesar de que dichos autores operan con diferente técnica analítica (*).

Con levadura prensada de panadería marca *Danubio* los resultados son bastante concordantes y obtenemos, en diferentes muestras, riquezas de ácido nicotínico de 28,6-28,5 y 28,3 miligramos por cada 100 gramos de materia seca.

En el caso de la levadura de cerveza estimábamos que los análisis hasta entonces realizados venían afectados por el error debido al líquido interpuesto (cerveza) entre las células de la levadura que, como hemos indicado, era prensada en el laboratorio. Aún refiriendo los análisis a la materia seca, ésta procedía en realidad de la levadura y de la cerveza interpuesta, y el contenido de ácido nicotínico en la última es, seguramente, muy inferior

(*) Autolisis de la levadura con acetona, hidrolisis alcalina y colorimetría después de adición de bromuro de cianógeno y metol, según Bandier y Hald (6).

al de la levadura. Para salvar este error procediendo en los siguientes ensayos a lavar las levaduras reiteradamente, con agua fría, unas veces, y con suero fisiológico, otras, separándolas de los líquidos de lavado por centrifugación, y prensando seguidamente. Tras un breve período de conservación en frigorífico, realizamos los análisis y vimos con sorpresa que las levaduras apenas conservaban trazas de ácido nicotínico después de los tratamientos indicados.

No parecía verosímil que la autolisis de las células hubiera avanzado tanto en frigorífico, en pocas horas o días, y, como aún no había llegado a nuestras manos el trabajo de Van Lanen, procedimos a multiplicar, sobre mosto de cerveza sin lúpulo, la *Torulopsis liquefaciens* de nuestra colección, partiendo de un cultivo viejo, *no aireado*, de dicha *Torulopsis* sobre agua de malta. Determinamos el ácido nicotínico en la levadura de siembra y en la recolectada después de tres días de cultivo, a 30°, durante los cuales se inyecta aire durante una hora, dos veces al día. Una muestra de levadura-cosecha es lavada con agua fría, otra muestra es lavada con suero fisiológico y una tercera muestra de levadura es analizada sin lavar y sólo después de prensar. Los resultados fueron:

LEVADURA	Milígramos de ácido nicotínico en 100 grs. de materia seca
Torulopsis liquefaciens, sembrada, procedente de cultivo viejo, no aireado, sobre agua de malta	9,3
Torulopsis liquefaciens, recogida después de tres días de cultivo y lavada con suero fisiológico	12,6
Torulopsis liquefaciens, cosechada después de tres días de cultivo y lavada con agua destilada	19
Torulopsis liquefaciens, cosechada después de tres días de cultivo, sin lavar	19,3

El lavado de la levadura con agua no influyó sensiblemente en el contenido de ácido nicotínico de la levadura, en la que verosímilmente no se había iniciado la autolisis, o había progresado muy poco, porque aún existía en el líquido de cultivo una notable proporción de hidratos de carbono.

Para salvar las deficiencias de los anteriores ensayos previos y conociendo ya los resultados obtenidos por el tantas veces citado Van Lanen, realizamos la siguiente experiencia: Partimos de un cultivo viejo de *Torulopsis liquefaciens*, en anaerobiosis relativa (sin airear, un litro de medio de cultivo en matráz cónico de 4 litros), y con esta levadura sembramos un litro de agua de malta contenido en un Erlenmayer de 5 litros de cabida, en el que se dispone un sistema de aireación continua a través de una placa de porcelana finamente agujereada (crisol de Gooch). Se mantiene la aireación durante veinticuatro horas a la temperatura de 25°. La levadura así rejuvenecida

es centrifugada; una parte de ella se destina a las determinaciones de materia seca y ácido nicotínico, y otra parte (equivalente a 1,2085 gramos de materia seca) es sembrado en un litro de agua de malta para cultivo en aerobiosis, dispuesto como el cultivo anterior, de multiplicación y rejuvenecimiento de la levadura para siembra. Los análisis de esta levadura se realizan inmediatamente después de las tomas de muestras.

A las cuatro horas se toma, asépticamente, una muestra de 600 c. c., que son centrifugados; la levadura es lavada con agua a 0°, en los tubos de la centrífuga, y sobre alícuotas determinamos la materia seca y la riqueza en ácido nicotínico.

Esta última determinación se realiza también para el líquido de cultivo centrifugado. Después de tres horas más (siete después de la siembra) se recogen y analizan del mismo modo nuevas muestras de levadura y de líquido de cultivo, centrifugando el líquido restante.

A continuación damos los resultados de los análisis y los balances de ácido nicotínico, después de cuatro y siete horas.

Torulopsis liquefaciens en cultivo, con inyección de aire, sobre agua de malta	Miligramos de ácido nicotínico			
	En el líquido de cultivo		En la levadura	
	Por litro	En la muestra	Por cada 100 grs. de materia seca	En la muestra
Al hacer la siembra.....	7,76	—	39	0,473
A las 4 horas.....	2,40	1,44	39,6	0,368
A las 7 horas.....	3,95	1,58	43,8	0,346

Los balances, al iniciar la experiencia y después de las cuatro y de las siete horas, pueden formularse del modo siguiente, refiriendo los datos a un volumen constante de 1.000 c. c. y al contenido total de levadura formada en este volumen:

Tiempos	MILIGRAMOS DE ACIDO NICOTINICO				
	En el líquido	En la levadura	Total	Fijados en la levadura	Cedidos al líquido
Al hacer la siembra.....	7,76	0,473	8,233	—	—
A las 4 horas.....	2,40	0,613	3,613	0,140	—
A las 7 horas.....	3,95	0,865	4,815	0,392	1,550 (*)

(*) Entre la 4.ª y la 7.ª hora.

De los datos del balance anterior se deduce que, al menos, han sido «metabolizados» entre la siembra y la cuarta hora 4,620 miligramos y entre la siembra y la séptima hora 3,418 miligramos de ácido nicotínico, lo que parece demostrar que entre la cuarta y la séptima hora la levadura ha sintetizado una cierta proporción de este ácido, sin que sea posible apreciar en la experiencia si hubo también o no hubo síntesis en las primeras cuatro horas.

COMENTARIOS

Las experiencias que quedan descritas son, evidentemente, incompletas y tienen el carácter de iniciales de una investigación más detallada, que en la actualidad está en curso. No procede, por lo tanto, formular conclusiones, pero en todos los ensayos parecen comprobarse los resultados de Van Lanen (1) lo mismo para las levaduras bajas, de cervecería que para la estirpe de *Torulopsis liquefaciens* (designación provisional), por nosotros aislada.

Con ambas levaduras en cultivos más o menos viejos, no aireados, o conservadas (después de separarlas de los caldos, por centrifugación) en frigorífico (a 4º-5º), en el que los fenómenos autolíticos deben ser muy lentos, obtenemos en los análisis cifras extraordinariamente pequeñas para la riqueza en ácido nicotínico.

Lavando rápidamente con agua muy fría (a temperatura igual o poco superior a 0º) las lavaduras obtenidas o conservadas en condiciones de anaerobiosis relativa, la proporción de ácido nicotínico se reduce aún más y puede llegar a ser casi nula.

En cambio, con levadura de cervecería recién traída de la fábrica y manipulada (para prensarla) en condiciones de aerobiosis, son mayores y normales (comparativamente con las cifras analíticas obtenidas con levaduras frescas, recién obtenidas en oxibiosis). En cultivos de *Torulopsis liquefaciens* en condiciones de amplia aerobiosis (inyección constante de aire) las riquezas en ácido nicotínico crecen en las primeras horas, por fijación en la levadura de la niacina contenida en el medio; otra parte del ácido nicotínico es destruída (metabolizada), y, desde la cuarta a la séptima hora (en nuestra experiencia) —y quizá durante todo el proceso—, la levadura sintetiza una cierta cantidad de ácido nicotínico. Durante siete horas no se advierte decrecimiento en la proporción de ácido nicotínico de la levadura cultivada en aerobiosis, aunque disminuye el ritmo del incremento en el citado ácido, después de la cuarta hora.

RESUMEN

Los autores utilizan para la determinación del ácido nicotínico el conocido método colorimétrico de los hidrolizados de la levadura, después de adición de bromuro de cianógeno y anilina, a pH = 7, según la técnica des-

crita por Grande Covian (4). La extinción es medida con fotómetro de Pulfrich-Zeiss, con filtro S-47, habiéndose comprobado previamente que la extinción se ajusta a la ley de Beer, al menos para riquezas en niacina comprendidas entre 2 γ y 20 γ en las alícuotas de líquido con que se opera.

Se estudian tres diferentes técnicas de hidrolisis previa de las levaduras:

a) Hidrolisis ácida directa, de la levadura fresca, centrifugada o prensada.

b) Hidrolisis ácida del extracto acuoso obtenido en autoclave, durante treinta minutos, a una atmósfera de sobrepresión.

c) Hidrolisis ácida del extracto (acuoso, a 100°) de la levadura autolizada a 50°-55°, después de adición de un 12 % de cloruro sódico. La decoloración de los hidrolizados se lleva a cabo con hidróxido de zinc, completándola eventualmente por adición de *Carbón activo seco, para análisis, de Merck*. Se comprueba que esta adición, siempre pequeña, no modifica los resultados de los análisis, pero puede prescindirse de esta decoloración complementaria, con carbón, si se resta de la cifra de extinción la hallada en una prueba en blanco, sin bromuro de cianógeno ni anilina. No hay variación sensible entre las cifras obtenidas a partir de cualquiera de las tres técnicas de hidrolización, por lo que se elige la hidrolisis directa, como más sencilla y rápida.

Parece que las levaduras no contienen trigonelina ni otros compuestos con N pentavalente, coordinado, puesto que las cifras obtenidas para el ácido nicotínico por otros autores, a partir de hidrolizados alcalinos de levadura de cerveza, coinciden de modo satisfactorio con las que nosotros logramos con técnicas de hidrolisis ácida, en las que no interfieren en la reacción coloreada los citados compuestos, biológicamente inactivos. Naturalmente, se titulan conjuntamente con el ácido nicotínico la amida del citado ácido y los complejos del mismo (codehidrasas I y II, otros derivados del ácido piridin-3-carbónico, etc.).

En las aún escasas experiencias propias, parecen confirmarse plenamente los resultados obtenidos por Van Lanen (1947-1) acerca del diferente comportamiento de las levaduras (en lo que se refiere al incremento en ellas del ácido nicotínico, fijado y sintetizado) según que su multiplicación y conservación (durante corto tiempo) se realice en condiciones de aerobiosis o de anaerobiosis relativa. Se comprueba también la «metabolización» (destrucción), durante los cultivos, de una buena parte de la suma de ácido nicotínico en las levaduras y en los medios.

Prosiguen los estudios para llegar a establecer conclusiones acerca de los temas que se enuncian en el título de esta primera NOTA, a la que seguirán sucesivas Comunicaciones.

BIBLIOGRAFIA

(1) J. M. VAN LANEN.—*The absorption of niacin by yeast-Arch. of Biochem.* 12, núm. January 1947, pág. 101.

(2) W. A. KREHL, F. M. STRONG AND C. A. ELVEHJEM. —*Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 15, 1943, pág. 471.

(3) E. C. BARTON-WRIGHT.—*The Analyst.* 70, 1945, pág. 283,y *Practical methods for the microbiological assay of the vitamins B complex and essential amino acids.—Ashe Laboratoires Ltd. (S. A.)*, pág. 15.

(4) F. GRANDE COVIAN.—*Revista Clínica Española III*, vol. VII, núm. 1, 1942. pág. 67.

(5) H. FINK UND F. JUST.—*Biochem. Zeitschr*, 303, 5-6 Heft., 1940, pág. 404.

(6) E. BANDIER AND J. HALD.—*Biochem. J.*, 33, 1939, pág. 264.

ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE LOS AEROBIOS HETEROTROFICOS DE LAS OSTRAS EN LA BAHIA DE SAN SIMON

Juan Blanco Díez del Valle

En el mes de agosto del año 1945, y organizada por el Instituto Español de Oceanografía, se llevó a cabo una campaña oceanográfica en aguas de la Ría de Vigo. Se trataba de un estudio físico, químico y biológico de dichas aguas. Nosotros prestamos particular atención a los prablemas biológicos de la Ría y realizamos además algunos ensayos de controles bacteriológicos en ostras.

En este trabajo recogemos las observaciones personales al propio que pretendemos dar una somera idea sobre las bacterias marinas.

LA ENSENADA DE SAN SIMON

Detalles generales.—La ensenada de San Simón es una dilatación de la Ría de Vigo experimentada en su terminación, pasado el estrecho de Rande a unas 15 millas de las islas Cíes, con una profundidad hasta de 8 metros en algunas zonas, mientras que, en otras, sobre todo al final, queda descubierto en las mareas de mediano coeficiente.

Su especial configuración y lejanía del mar libre hace que las aguas que la bañan no sean turbulentas y estén libres de influencia de los temporales, siendo, sin embargo, continuamente renovadas por el flujo y reflujo de las mareas.

En su seno desembocan las aguas dulces de distintos ríos: Redondela, Mayor, Porcos, etc., que debilitan la salinidad oceánica y acarrean nuevas remesas de plancton, contribuyendo de esta manera a beneficiar el medio para el mejor desarrollo de ciertas especies de moluscos comestibles que allí

Microbiología Española.—Vol. 1.º 1947. *Presentado el día* 5 *de mayo de* 1947.

viven, de innegable interés industrial. El fondo es de arena fangosa, aumentando el porcentaje de fango a medida que se asciende por la ensenada hacia el interior.

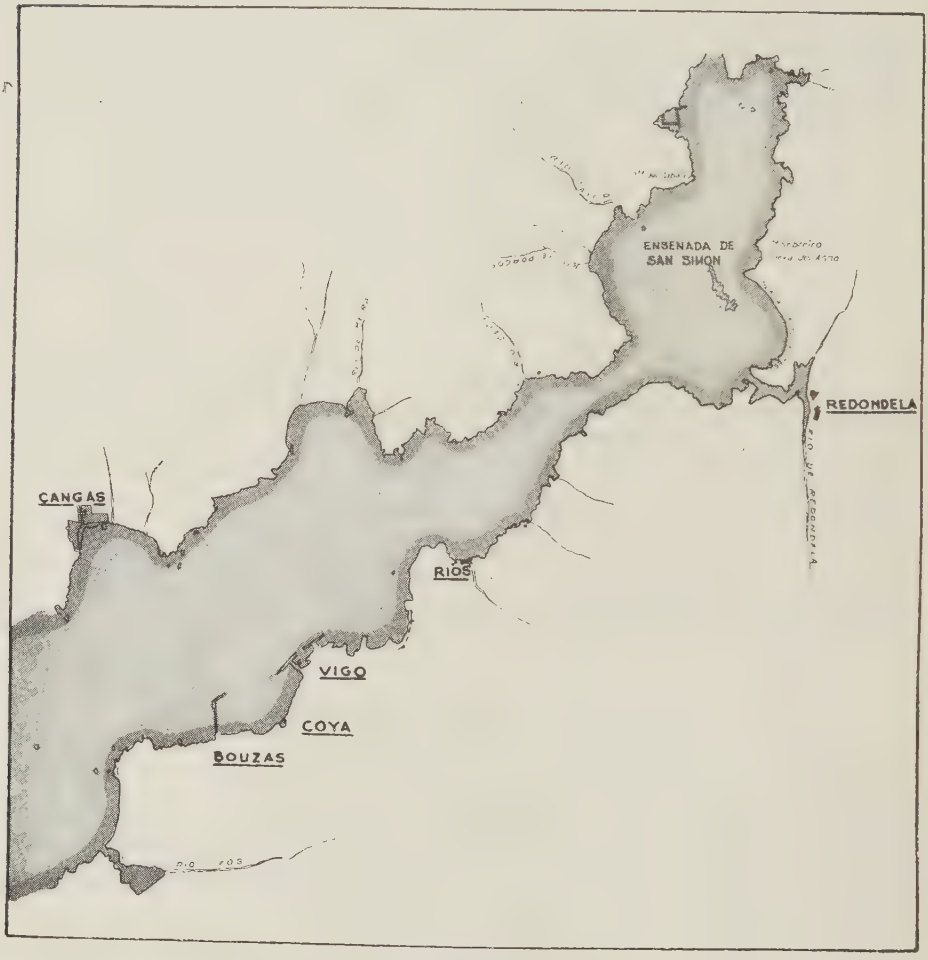


Fig. 1. Esquema de la Ria de Vigo.

Plancton.—En casi todas las operaciones realizadas por la ría hemos hecho uso de la manga de plancton, tanto fuera como dentro de la ensenada, comprobando, en ambos casos, a simple vista, una gran abundancia de materia orgánica planctónica. Examinado al microscopio hemos encontrado un predominio casi absoluto de fitoplancton, es decir, de seres microscópicos pertenecientes al reino vegetal, mientras que aparecen escasas las especies animales.

Fitoplancton.—La mayor parte del fitoplancton está formado por un dinoflagelado, el Goniaulax Polyedra, Stein. La superabundancia del Goniaulax Polyedra tiñe a las aguas de un color rojo sanguinolento, característico durante el verano en las rías bajas gallegas, conocido en Galicia desde los tiempos más remotos con el nombre de «purga de mar».

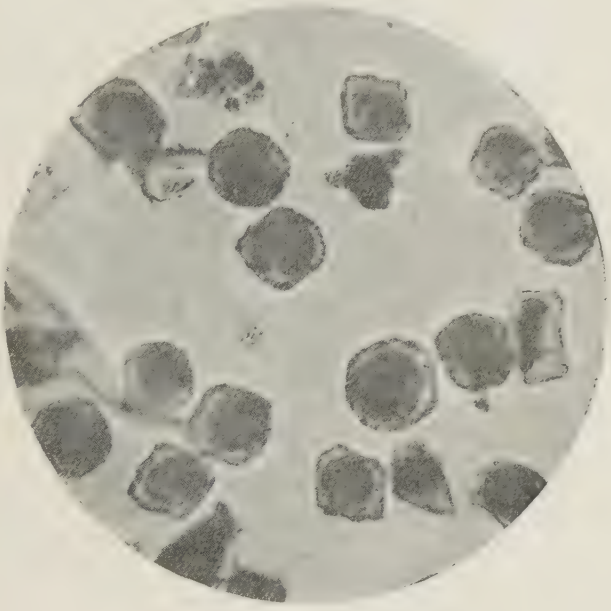


Fig. 2. Goniaulax Polyedra.

También a este fenómeno va acompañado—por lo que se le atribuye la misma causa—el de una maravillosa fosforescencia de las aguas al ser removidas con cualquier motivo.

Según el Dr. J. Gibbard, del Departament of Pensions and national Health de Otawa, cierta toxicidad de los mejillones se halla ligada a la abundancia en el plancton de un individuo del mismo género del que venimos ocupándonos como causante de la «purga de mar», pero de distinta especie. Se trata del «Goniaulax catenella», al que se atribuyen las causas de graves intoxicaciones sufridas en 1936 y 1939 por personas que había ingerido mejillones (Mytilus) procedentes del canal de Zeebruge (Bélgica).

BACTERIAS EN EL MAR

Durante muchos años se ha sostenido por algunos autores que las bacterias no podrían prosperar en el medio marino, sobre todo en aquellos lugares alejados de la costa. Esta opinión, reflejada incluso en los libros de texto, la

fundamentaban en la salinidad del agua del mar, pobreza de materia orgánica, abundancia de enemigos naturales, efecto germicida de las radiaciones ultravioletas cerca de la superficie y fuerte presión y escasa temperatura en las profundidades. Consideraban que las bacterias encontradas en aguas costeras podían más bien ser consideradas como de origen terrestre.

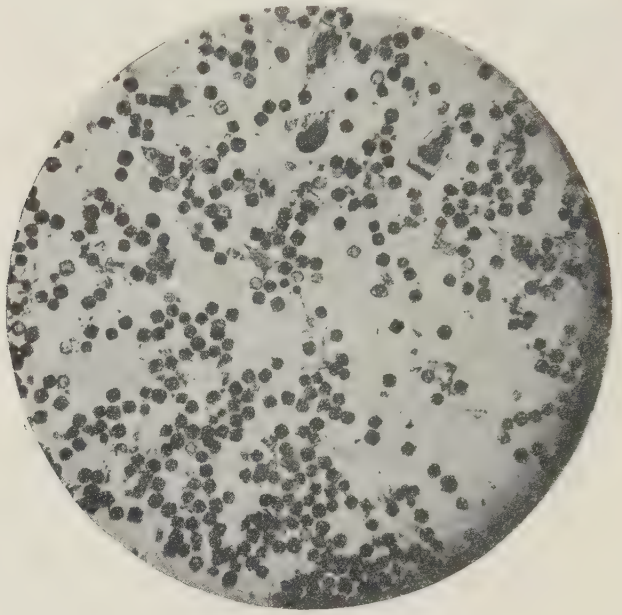


Fig. 3 Plancton de Peridíneas.

Modernas investigaciones demuestran, por el contrario, que las bacterias están ampliamente distribuídas por el mar, y que ni la latitud ni la temperatura del agua influyen en su distribución, pues se han encontrado en las regiones árticas y antárticas, así como en las regiones tropicales. La densidad de población oscila entre varios millares y unos centenares por centímetro cúbico de agua.

La profundidad también influye, de manera que a partir de los cien metros son menos abundantes.

El análisis de muestras de agua recogido diariamente desde el extremo del muelle del Instituto Scripps de Oceanografía, durante un período de diez años, revela que la distribución en las distintas épocas del año guarda cierto paralelismo con la del fitoplancton. Por lo general la mayor población bacteriana se presenta de enero a marzo y la menor de mayo a julio.

La mayor riqueza se encuentra en el fondo del mar. A pesar de que la temperatura puede oscilar desde 0,5° C. a 2,5° C., y que la presión hidrostática puede ascender a varios centenares de atmósferas, hay con frecuencia

tantas bacterias en el fondo marino como en el terreno fértil. La capa superior del fango que está en contacto con el agua que la cubre contiene varios millones de bacterias por gramo.

Las bacterias auténticamente marinas difieren de las terrestres por varios motivos. Aproximadamente, un 63 por ciento son bacilos, 32 por ciento espirilos y 5 por ciento son cocos o esféricos. El tamaño no excede de una micra de diámetro y suelen llevar uno o más flagelos que les sirven para sus desplazamientos. Predominan las formas gram-negativas. Muchas son cromógenas, produciendo pigmentos amarillos, pardos, rojos, púrpura, azul y a veces verde. Muy pocas bacterias marinas eurihalinas o tolerantes para los cambios de sal, resistiendo difícilmente concentraciones superiores al 6 por ciento.

Las bacterias marinas tienen una gran importancia y su estudio escapa del campo de la ciencia pura para entrar de lleno en el de la ciencia aplicada.

Pese a su insignificante tamaño, es tan prodigioso su número que el peso total de las bacterias marinas se extima no inferior a 10 millones de toneladas. Suponiendo que se multiplicaran solamente una vez por día, la producción anual excedería de los tres trillones de toneladas.

Estos cálculos están basados sobre un promedio de población de 10 bacterias por c. c.

No es, sin embargo, la masa lo verdaderamente interesante sino los efectos trascendentales sobre el mar. Diversas experiencias indican que las bacterias influyen en la composición y concentración del nitrógeno, del azufre y de los compuestos de fósforo, así como en el contenido orgánico del agua del mar.

Debido a su acción mineralizadora de la materia orgánica, ha sido caracterizado el mar como «el recipiente séptico más grande y más eficiente del mundo».

Como fuente de alimentación las bacterias son consumidas por muchos animales, tanto grandes como pequeños. No sólo los protozoos y copépodos prosperan sobre una dieta de bacterias: mejillones, ostras, tunicados y gusanos pueden vivir alimentándose únicamente de ellas

Tienen además una marcada influencia geológica las bacterias marinas ya que, al alterar la concentración de ión-hidrógeno, varían la precipitación o disolución de la caliza; representan igualmente un importante papel en el depósito de barro ferroso y precipitación de los compuestos de manganeso.

Todavía no está determinado si las bacterias desempeñan alguna misión en la génesis de los petróleos. Pero sí consideramos que el petróleo procede de las transformaciones de la materia orgánica en el fondo del mar por agentes biológicos, químicos y geofísicos, y que las bacterias están presentes en los estratos potencialmente originarios del petróleo no sería muy arriesgado atribuirles misión en este fenómeno.

Pero lo que principalmente nos interesa en esta ocasión son las bacterias como agentes patógenos.

Aunque las bacterias marinas son predominantemente benéficas, hay unas cuantas que son patógenas o productoras de enfermedades.

El bacilo tifoideo, el vibrión que produce el cólera y otros, pueden permanecer vivos durante unos pocos días después de sumergidos en el mar, y de ahí que el agua marina contaminada por el hombre puede constituir un posible peligro, pero afortunadamente tales bacterias mueren pronto en el mar.

Sin embargo, en las bahías y aguas litorales el agua puede estar contaminada por las alcantarillas y constituir un peligroso riesgo para los bañistas y consumidores de ostras y otros mariscos.

Los accidentes de origen ostrícola no son una invención de los sanatorios modernos. Nació esta idea cuando, en el año 1896, el profesor Chantemesse presentó a la Academia de Medicina de París una comunicación denunciando la presencia de una epidemia de gastroenteritis grave, que atacó a varias personas que habían comido ostras procedentes del mismo parque. Dos de estas personas sufrieron una fiebre tifoidea bien característica, falleciendo una de ellas.

En los años 1899 y 1900 Mosny hace los controles sanitarios en todos los parques ostrícolas franceses, y apenas encuentra alguno ligeramente contaminado. En 1904, Giard, hace un estudio detallado de las enfermedades de la ostra y demuestra que ellas son inofensivas para el hombre. Admite la posibilidad de que la ostra pueda servir de vehículo transmisor, pero sólo en casos raros y cuando ocurren circunstancias excepcionales. Otros autores definen diferentes puntos de vista, sin lograr ponerse de acuerdo sobre el peligro de la ostra como agente transmisor de enfermedades. Tan sólo en Francia se estima que, durante los últimos quince años, han ocurrido más de cien mil casos de tifoidea debidos al consumo de mariscos: de ellas veinticinco mil terminaron mortalmente. De lo que hoy se trata, o mejor dicho, ya está resuelto con éxito, es de aminorar este peligro o evitarlo.

La ostra, siendo especie marina, vive y prospera mejor—porque se alimenta más—en aquellas zonas que están próximas a las desembocaduras de los ríos, en donde al plancton marino se suma el que continuamente acarrean las aguas dulces.

Estas aguas han ido recogiendo en su itinerario toda clase de productos de deshecho: alcantarillas, cloacas, vertederos, resíduos, tierras erosionadas, etcétera, y por esto llegan muy ricas en gérmenes, algunos de ellos patógenos, tales como B. coli, Streptococcus fecalis, Cl. Welchii, Bact. tiphosum, V. Cholerae, Proteus vulgaris, etc.

La ostra se infecta por criarse en aguas contaminadas. Según Eyre, cada hora entran y salen en una ostra unos dos litros de agua, que son filtrados a través de sus branquias, reteniendo microbios, protozoos, diatomeas..., que le sirven de alimento. La flora bacteriana de la ostra está determinada por la naturaleza del agua en que está sumergida. Chantemesse hizo la siguiente

experiencia, que lo comprueba: Colocó ostras durante veinticuatro horas en agua de mar contaminada por deyecciones tíficas; transcurridas otras veinticuatro horas, después de extraídas del agua, fué examinado su contenido intestinal y encontrado en el «Bacilo coli» y «Bacilo de Eberth».

La contaminación de la ostra se hace, pues, a través del agua en que vive y los gérmenes que alberga su intestino, así como el del líquido intervalvar, no son, ni más ni menos, que los que viven en el agua que las baña.

Análisis bacteriológicos.—Mediante métodos bacteriológicos se intenta determinar con frecuencia si las ostras están o no en condiciones de ser consumidas por el hombre. La técnica general de estos análisis es semejante a las seguidas para determinar el grado de salubridad de las aguas, debiéndose conceder particular atención al número de bacilos coliformes.

Las dificultades que presentan estas clases de análisis son grandes, y por ello cada autor intenta vencerlas con arreglo a su particular criterio, sin que por el momento exista un método tipo seguido por todos los analistas.

El examen bacteriológico no nos resuelve de una manera categórica la contaminación de un banco, si nos hemos limitado a analizar un solo individuo. Puede ocurrir muy bien que el ejemplar estudiado esté perfectamente sano y, en cambio, haya un porcentaje elevado de ostras contaminadas en el mismo vivero. Esto se debe a que los gérmenes patógenos, al llegar al mar procedentes de las aguas dulces—cuando no son numerosos—, pueden quedar agrupados en grumos y unas ostras los ingieren y otras no. Por ello se toman siempre varios ejemplares, generalmente diez, elegidos al azar, para manipular en el labóratorio.

Controles bacteriológicos realizados (1).—Empezamos por esterilizar el material de vidrio a calor seco en hornos calentados a 160°, durante media hora. Seguimos la técnica de Bigger, ya usada y descrita por los señores Souto y Beato.

a) **Medio de cultivo.**—El medio de cultivo empleado ha sido el de Caldo-lactosa-bilis, preparado de la siguiente manera:

Para un litro de caldo.

Quinientos gramos de carne de vaca, desprovista de grasa, nervios y aponeurosis:

1.º Picarla.

2.º Se deja macerar en un litro de agua, durante veinticuatro horas, a la temperatura ambiente.

3.º Hervir durante media hora.

(1) En esta parte práctica han compartido el trabajo con nosotros D. Olegario Rodríguez y D. Ramón F. Crehuet, ambos de la Sección de Biología del I. E. de Oceanografía.

4.º Se filtra con papel de filtro, previamente mojado, para que retenga la grasa.

5.º Se pasa la carne por una prensa para extraer los restos de caldo, que es igualmente filtrado.

6.º El líquido filtrado se completa con agua corriente hasta un litro.

7.º Se añade:

Peptona	20 gramos.
Cloruro sódico	5 »
Taurocolato	5 »
Lactosa	10 »
Indicador de Andrade	10 c. c.

A falta de Taurocolato tuvimos que usar bilis de vaca.

El indicador de Andrade lo preparamos así:

Agua	100 c. c.
Fuchina ácida	4 grs.
Sosa al 4 por 100	10 c. c.

8.º Ajustar el pH a 7,6 aproximadamente.

9.º Esterilización en autoclave, a una atmósfera, durante unos veinte minutos; 120º centígrados.

b) **Técnica.**—Tomamos personalmente de los parques diez ostras elegidas al azar. Se lavan con agua y jabón, y aclaran con agua estéril. Abrirlas con la mayor limpieza posible. El cuerpo—sin líquido intervalvar—de la ostra se pasa a una probeta graduada A (véase el esquema de la página siguiente), donde se añade solución salina al 2 por 100, hasta la marca que señalan los 20 c. c. y se machaca con una varilla estéril de cristal. A estos 20 c. c. de emulsión de ostra en solución salina se llama «molusco reconstruído» y representamos por M. R.

Añadimos a la misma probeta A otros 20 c. c. de solución salina al 2 por 100, y tenemos 40 c. c. de una dilución al 1/2 de molusco reconstruído, que representamos por 1/2 M. R.

Con pipeta estéril se toman 2 c. c. de 1/2 M. R. (probeta A) y lo añadimos a dos tubos, I y II (1 c. c. en cada tubo), que tienen caldo-lactosa-bilis, con tubo de fermentación.

Con la misma pipeta se toman 2 c. c. nuevamente de la probeta A (1/2 M. R.), lo depositamos en otra probeta, B, que tenga ya 8 c. c. de solución salina al 2 por 100. Tenemos una dilución al 1/10 de M. R. Tomar 2 c. c. de 1/10 M. R. (probeta B) y añadir a dos tubos III-IV (1 c. c. en cada tubo) con caldo y tubo de fermentación.

Con la misma pipeta tomar 0,4 c. c. de 1/10 M. R. y añadirlo a los tubos V-VI (0,2 c. c. a cada tubo) con caldo y tubo de fermentación.

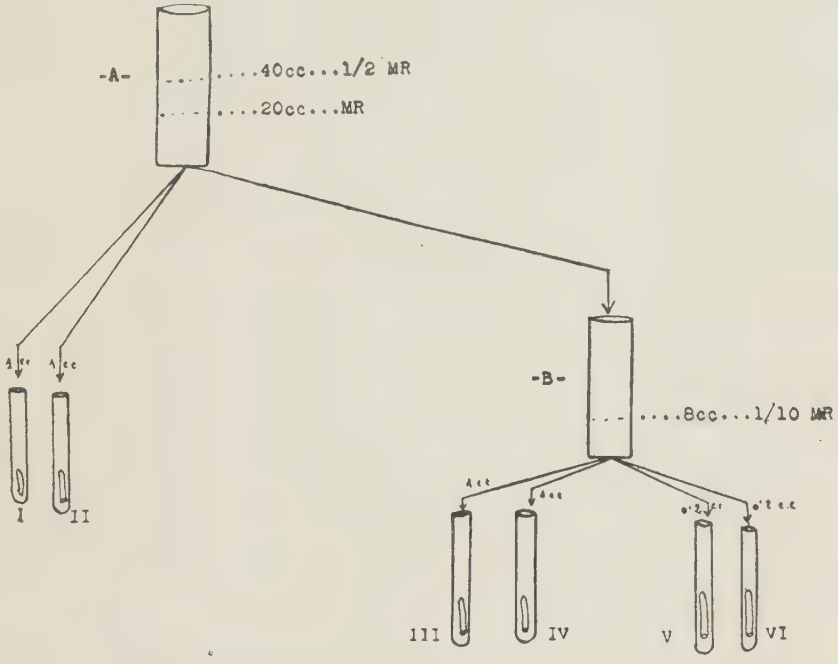


Fig. 4

Estas operaciones, y con material distinto, se repiten en cada uno de los nueve moluscos restantes y, al final, tendremos sesenta (60) siembras—seis por cada ostra—, en otros tantos tubos, que incubamos en la estufa durante veinticuatro horas a 37 grados.

Transcurridas las veinticuatro horas en la estufa, se procede a la lectura de tubos, anotando las observaciones con las siguientes letras indicadoras:

A) Muy ácido. El medio aparece teñido de rojo intenso.

a) Ligera acidez. Color anaranjado.

G) Gran cantidad de gases en el tubo de desprendimiento. Más de 1/6 del tubo.

g) Gas en poca cantidad.

En) Enturbiamiento.

Según Bigger, un parque debe considerarse contaminado cuando de los moluscos examinados se lee A y G en más de siete, en la primera dilución

(tubos I-II), o de tres de la segunda (tubos III-IV), o de uno de la tercera (tubos V-VI).

Hemos seguido esta técnica en los dos ensayos realizados. El primero lo realizamos con un lote de ostras (diez) procedente de la Concesión de la «Cueva del Asno».

Los resultados, después de veinticuatro horas de estufa, pueden leerse en el cuadro siguiente.

Primera prueba

TUBO.	I	II	III	IV	V	VI
Ostra 1.ª.....	En	E n	En	—	—	En
» 2.ª.....	—	—	—	En	—	En
» 3.ª.....	En	—	—	—	—	—
» 4.ª.....	—	—	—	—	—	—
» 5.ª.....	En	A	—	—	—	En
» 6.ª.....	g	g	—	En	—	—
» 7.ª.....	—	—	—	—	—	—
» 8.ª.....	—	a	—	—	—	—
» 9.ª.....	ab	—	—	—	—	—
» 10.ª.....	—	—	—	—	—	—

Cada fila corresponde a una ostra y cada columna a las distintas diluciones de los tubos.

CONCLUSION

Sin contaminación de importancia para el consumo, ya que sólo en muy pocas siembras se observa enturbiamiento y únicamente en la ostra señalada con el número 5 encontramos el medio teñido de rojo y en el número 6 algo de gas. En ambos casos en la primera dilución (tubos I y II).

Segundo ensayo.—Se hizo con un lote procedente de la que hemos

venido llamando en este trabajo «concesión tolerada» situada en las proximidades de Redondela.

Los resultados van señalados en el cuadro siguiente.

Segunda prueba

TUBO.	I	II	III	IV	V	VI
Ostra 1.ª.....	ga	g	—	a	—	g
» 2.ª.....	g	g	g	g	ag	—
» 3.ª.....	—	g	g	G	g	g
» 4.ª.....	E	—	—	—	—	—
» 5.ª.....	g	g	—	—	—	—
» 6.ª.....	—	—	—	—	—	—
» 7.ª.....	g	g	—	—	—	—
» 8.ª.....	—	g	—	g	g	—
» 9.ª.....	G	—	—	g	—	—
» 10.ª.....	g	g	g	g	—	—

CONCLUSION

En casi todas las siembras de este segundo lote se observa desprendimiento de gas y en algunas de ellas ligera acidez. Contaminadas.

Este resultado guarda relación con la proximidad del parque a una fábrica de conservas cuyas alcantarillas vierten directamente al mar y precisamente en una zona muy rica en especies comestibles, en particular almejas, por lo que la consideramos como un foco de contaminación digno de tenerse en cuenta al tratar de la higiene en aquella zona de la Ensenada. Y a este propósito nos es grato consignar que—según nos informaron—en la isla de San Simón, que hace poco fué igualmente foco de contaminaciones, se han hecho recientemente pozos asépticos, precisamente para evitar este peligro.

Sería grave omisión el cerrar este capítulo sin hacer constar nuestro más expresivo agradecimiento a D. Francisco Rubira, director gerente de los Laboratorios Bioquímicos «Miguel Servet», de Vigo, que puso a nuestra absoluta disposición el laboratorio bacteriológico de dicho centro, así como por las atenciones personales que nos dispensó en todo momento.

Depuración de las ostras.—Para conseguir ostras depuradas, limpias de toda clase de gérmenes nocivos y en disposición, por tanto, de ser consumidas

por el hombre sin temor ninguno a la infección, bastará hacerlas vivir durante unos días en unas aguas que no estén contaminadas.

Está plenamente demostrado, por repetidas experiencias, que en ostras infectadas, colocadas en agua de mar purificada, evacuan por completo, en tres o cuatro días, el contenido de su tubo digestivo con los gérmenes y antes de la semana puede considerarse que el molusco se halla del todo depurado y es, por consiguiente, inofensivo.

Se hace imprescindible, pues, para seguridad de la salud pública, disponer de balsas o estanques de depuración en todos los parques ostrícolas—ya sean viveros naturales o artificiales—, por donde se harán pasar unos días las ostras destinadas al mercado. El problema es disponer de agua en buenas condiciones higiénicas para llenar los estanques depuradores.

Ya hemos dicho anteriormente que el agua de mar, por su salinidad, no es un medio adecuado para el desarrollo bacteriano, ya que todas las soluciones salinas, a partir de una concentración determinada—no es preciso que sea muy elevada por lo general—, tienen acción bactericida.

Es conveniente para este fin depurador, por lo tanto, que el agua elegida no proceda de la proximidad de desembocaduras de aguas dulces, pues cuanto mayor sea la salinidad—repetimos—menos facilidades vitales encontrarán los microbios y, por tanto, serán más escasos.

Está demostrado, por otra parte, que el simple almacenamiento del agua en un embalse es suficiente para hacer disminuir enormemente su contenido bacteriano.

Houston observó en 1933 que, después de guardada durante tan sólo quince horas, el agua de un río, había sufrido una reducción del 40 por 100 de los gérmenes. La causa de esta autodepuración, por almacenamiento, la explica el mismo Houston por:

a) **Sedimentación.**—Los gérmenes se adhieren a las partículas de materias suspendidas y progresivamente van formando grumitos y zoogleas que, poco a poco, caen al fondo del depósito y dejan el agua más pura.

b) **Desvitalización.**—En estos depósitos mueren los gérmenes en grandes cantidades, probablemente por falta de alimento y por ser ellos mismos devorados por los protozoos.

Houston añadía «Vibriones coléricos» al agua de río natural y observaba, a los siete días de estar almacenada, que su número se había reducido en un 99,9 por 100, y esta reducción se aprecia en toda clase de gérmenes. Afirma este autor que, incluso sería mas eficaz, para reducir el número inicial B. tíficos y de V. coléricos, una semana de almacenamiento que la filtración por arena.

A esta autodepuración hay que añadir los efectos esterilizantes de la luz solar, que hace que las aguas superficiales sean más puras que las profundas. Ha sido utilizada también en la esterilización de las aguas la luz ultravioleta artificial; Foulds (1911) considera fácil asegurar por este procedi-

miento una reducción del 90 por 100 de los seres bacterianos, incluído en este porcentaje la totalidad de B. coli.

BIBLIOGRAFIA

BORDE, DIENERT ET HINARD.—*Le contrôle sanitaire de l'ostreiculture. (Notas y memorias de l'Off. des Pêch. Marit.*, núm. 10, mes XII, 1921.)

CARUS FALCON.—*Los misterios de la Naturaleza. Investigación sobre el micro-plancton de la Ría de Arosa* (La Coruña), 1903.

DANGEARD, P.—*Annales de l'Institut Oceanographique*, tom. III, fasc. VII, y tom. IV, fasc. VIII, 1926-27.

HINARD, G. ET LAMBERT.—*Tableau de l'Ostréiculture française. (Rev. des Trav. de l'off des Pêch. Marit.*, tom. I, facs. III y IV, 1928.)

IPIENS LACASA, A.—*Investigaciones químicas. (Memorias del Instituto Español de Oceanografía*, tom. II, Memor. II. Madrid,)

JOHNSTONE, SCOTT AND CHADWICK.—*The Marine Plankton.* 1924.

JORGENSEN.—*Die Ceratien.* 1911.

LEBOUR, M. V.—*The Dinoflagellates of Northern Seas.* 1925.

NAVAZ Y SANZ.—*El problema sanitario de los moluscos comestibles en relación con la ría de Vigo. (Industrias Pesqueras*, núm. 261. Vigo. 1938.)

NAVAZ Y SANZ.—*Ostricultura y repoblación de la ría de Vigo.* (Ibídem, núm. 286. 1939.)

NAVAZ Y SANZ.—*Salvaguardia y protección de los moluscos comestibles.* (Ibídem, número 304. Vigo. 1939.)

NAVAZ Y SANZ.—*Estudio de los yacimientos de moluscos comestibles de la ría de Vigo. (Trabajo núm.* 16 *del Instituto de Oceanografía.* Madrid. 1942.)

PAUSLEN, OVE.—*Etudes sur le Microplancton de la mer d'Alboran. (Trabajo núm.* 4 *del Inst. Español de Oceanografía.* Madrid. 1931.)

SOBRINO BUHIGAS, R.—*La purga de mar o Hematotalasia. (Mem. de la Soc. Esp. de Hist. Natural*, t. X, Mem. 9, año 1917.)

SOUTO, J. Y BEATO, F.—*El control de los parques y criaderos de moluscos. (Rev. de Sanidad e Higiene Pública.* 1935.)

TOPLEY Y WILSON.—*Bacteriología e inmunidad.* Barcelona. 1942.

ZAPATERO, S. Y GRACIAN, M.—*Manual de técnica bacteriológica.* Valladolid. 1941.

BENECKE W.—*Bakteriologie des Meéres. (Abderhalden's Hanbd. der biol. Arbeitsmethoden*, 404, 7177-854. 1933.

ZOBELL, C. E. AND MATHEWS, H. M.—*Are there specific marine bacteria. (Proc Fifth Pacific. Sc i.Cong. Vancuver*, 3, 2097-2100. 1933.)

ZOBELL, C. E. AND MATHEWS, H. M.—*Preliminary studies on the distribution and characteristics of marine bacteria. (Bull. Scripps Ins. Oceano., tech. ser.*, 3, 279-295. 1934.)

ZOBELL, C. E. AND MATHEWS, H. M.—*A qualitative study of the bacterial flora of sea and land breezes. (Proc. Nat. Acad. Sci.*, 22, 597-572.

DR. CLAUDE E. ZOBELL.—*Bacteria of the marine World. (October*, 1942, vol. LV 320-330.)

BURKE, V.—*The interchange of bacteria between fresh water and the sea. (Jour. Bact.*, 27, 201-205. 1934.)

COUPIN, H.—*Sur la resistance à la saluves des bactéries marines. (Compt. rend de l'Acad. des Sci.*, 16, 443-445. 1915.)

DREW, G. H.—*The action of different Bacteriological counting methods. (Jour Bact.*, 23, 43-44. 1911.)

KOSER, S. A. AND SAUNDERS, F.—*Accessory growth factors for bacteria and related microorganisms. (Bact. Rev.*, 2, 99-160. 1938.)

LIPMAN, C. B.—*The concentration of sea water as affecting its bacteria population. (Jour. Bact.*, 12, 311-313. 1926.)

RENN, C. E.—*Effects of marine mund upon the aerobic decomposition of plankton materials. (Biol. Bull.*, 78, 54-462.)

ZOBELL, C. E. AND MICHENER, H. D.—*Studies on the bacterial flora of marine bottom sediments. (Jour. Sedimentary Petrology*, 8, 10-18. 1938.)

ZOBELL, C. E. AND MICHENER, H. D.— *A paradox in the adapttion of marine bacteria to hypotonic solutions. (Sci.*, 87, 328-329. 1938.)

TRABAJOS DE LA CATEDRA DE MICROBIOLOGIA AGRICOLA E INDUSTRIAL DE LA ESCUELA ESPECIAL DE INGENIEROS AGRONOMOS

Contribución al estudio de la determinación, en las tierras, del ácido fosfórico asimilable por vía biológica

Pedro Baudín Sánchez y Javier Cremades Adaro

(Primera comunicación, presentada por Juan Marcilla Arrazola)

CONSIDERACIONES PREVIAS

El análisis de las tierras, con finalidades agronómicas, es una tarea muy compleja, y aún suponiendo que todas las determinaciones físicas, físico-químicas y químicas sean realizadas con la posible exactitud, queda la labor más difícil en la interpretación de los datos obtenidos, si deseamos relacionarlos con la influencia que cada factor aisladamente, y todos en conjunto, han de ejercer en la vida de los vegetales que han de vivir sobre el suelo que se estudia.

Los métodos químicos nos dan cifras halladas como resultado de enérgicos tratamientos, con fuertes ácidos o bases, disminuyendo o aumentando bruscamente la temperatura, cambiando la naturaleza de los componentes para llegar a uno o varios, aislables y fácilmente determinables. Después de estos complejos procesos se llega muchas veces a obtener datos cuya realidad puede no ser discutible, pero que no siempre nos dan orientación concreta acerca de la asimilabilidad por la planta de las sustancias que se han analizado.

Bastan las anteriores consideraciones para justificar la conveniencia de completar los análisis por vía química o físico-química con determinaciones por vía biológica, que cuando llegan a ponerse a punto pueden resultar insustituíbles y decisivos y en todo caso ofrecerán la ventaja de la enorme sensibilidad de muchas respuestas biológicas. Por ejemplo, en el transcurso de nuestro trabajo bastó la adición de 0,00001 gramo de fosfato disódico a una muestra de tierra procedente de «Los Manaderos» (Lucena-Córdoba) para lograr en las condiciones de la experiencia un aumento de peso, en los micelios de *Aspergillus niger*, de 0,0259 gramos, o sea de 2590 veces el peso del fosfato añadido.

El método Mitscherlich (1) basado en los análisis de ácido fosfórico en las

cosechas obtenidas en condiciones «standard», es un excelente método biológico, pero demasiado engorroso y largo (varios meses). Por eso algunos investigadores trataron de sustituir las plantas superiores por organismos de rápido crecimiento y fácil cultivo, como los hongos filamentosos.

Butkewitsch propuso el *Aspergillus niger*, y los trabajos de Burk, Lineweaver, Kiessling, Niklas, Poschenrieder (2), Wilson, Mehlich (6), Trichler (3), Varallyay (4), Smith (5), Schlots (7), Stok Jurgen (8), Mooers (9), Mulder (10)..., etcétera, desembocaron en resolución de la Comisión IV del Congreso Internacional de la Ciencia del Suelo (Copenhague, 1933) aceptando este método biológico de análisis de las tierras, ceñido por ahora solamente a las determinaciones de P_2O_5 y K_2O, aunque existen trabajos de varios autores sobre la investigación por vía biológica de las deficiencias del cobre, magnesio y otros elementos. Hasta ahora la aplicación más generalizada de los métodos que emplean como «test» biológico al *Aspergillus niger* es la determinación del ácido fosfórico asimilable en los suelos

Con frecuencia, los métodos biológicos presentan la desventaja de que responden mejor en las zonas de concentraciones medias y son menos precisos para las extremas, lo que reduce el espacio entre el umbral y la máxima entre los que son aplicables, pero, de todas maneras, la rapidez, comodidad y economía de tales métodos hacen que pueda asegurarseles un porvenir extraordinario especialmente en los análisis con finalidades prácticas, agrícolas e industriales.

Encargados de estudiar por el método del *Aspergillus niger* la determinación del P_2O_5 asimilable en los suelos, dividimos el trabajo en dos partes:

a) Obtención de resultados y comparación de datos obtenidos con tres razas de *Aspergillus niger:* la *Boas-Poschenrieder,* y las seleciconadas para fermentaciones cítricas, *Instituto Cajal* núm 3 y N. R. R. L. *(Peoría)*, n.º 67.

b) Interpretación de resultados y discusión de algunas anomalías que nos fueron apareciendo en el transcurso de los días.

Queremos hacer constar que en todo momento consultamos a nuestro profesor Don Juan Marcilla, al que nos complacemos en agradecer, públicamente, sus consejos. Asimismo debemos gratitud a los Investigadores del Instituto de Microbiología General y Aplicada, los cuales nos prestaron todo género de facilidades para nuestro trabajo, especialmente la doctora en Farmacia señorita Pilar Aznar, que nos orientó y asesoró en la parte concerniente al análisis de las tierras, y a nuestros compañeros que, trayéndonos muestras de suelos de sus localidades de origen, nos proporcionaron un material amplio y heterogéneo, básico para el cumplimiento de nuestra labor.

TECNICAS EXPERIMENTALES

Para la determinación del ácido fosfórico por vía biológica seguimos, con escasísimas variantes, la preconizada por A. M. Smith y A. Dryburgh (5), que difiere muy poco de la seguida por Niklas, Poschenrieder y Trischler (3).

Para comodidad de los lectores a quienes no sea fácil consultar los citados trabajos, detallamos a continuación la técnica empleada.

Como vasos de cultivo utilizamos bocales (frascos de boca ancha) de unos 300 c. c. de cabida (Smith y Dryburgh operan con frascos más pequeños, de unos 130 c. c.).

La composición del medio fundamental de cultivo es la siguiente:

Sacarosa			10	gramos.
Acido cítrico			1	»
Peptona de carne, Merck			0,1	»
Nitrato amónico			0,36	»
Sulfato magnésico			0,03	»
K_2O (en forma de sulfato)			0,02	»
Cu	íd.	íd.	0,00015	»
Fe	íd.	íd.	0,0001	»
Zn	íd.	íd.	0,0001	»

Agua destilada hasta completar 100 c. c.

Cada bocal recibe 30 c. c. de este medio fundamental, al que se añaden 2,5 grs. de la tierra (Schmidt y Dryburgh adicionan 5 grs., lo que puede ser conveniente para tierras muy pobres en P_2O_5) y son sembrados con una suspensión de esporas de la raza de *Aspergillus niger* que se utilice como «test». Los autores a los cuales seguimos han demostrado que amplias variaciones en la concentración de la siembra (entre 1 y 10^6) no tienen influencia sensible en los resultados de los ensay$_0$s. En cambio apuntan las notables variaciones de las cosechas de micelio según el diámetro de los frascos o bocales para los cultivos, y, deseando comprobar este último extremo, procedimos a ensayar las respuestas obtenidas con bocales de diámetros interiores de 3;5,8;7 y 10,3 centímetros y siembras de esporas de las tres razas de *Aspergillus niger*, con las que trabajamos. El Estado núm. 1 resume los resultados de este ensayo previo:

ESTADO NUM. 1

Cosechas de micelios obtenidas con la técnica de Schmidt y Dryburgh en bocales de diferentes diámetros interiores.

Diámetros de los bocales	PESOS DE LOS MICELIOS DE «ASPERGILLUS NIGER». ADICIÓN DE TIERRA DE LA MONCLOA (MADRID): 2,5 GRAMOS POR BOCAL		
	Raza Boas-Poschenrides.	Raza núm. 3 Instituto Cajal.	Raza N. R. R. L.-67
Centímetros.	*Gramos.*	*Gramos.*	*Gramos.*
3	0,7432	0,4813	0,7983
5,8	0,8013	0,5942	1,0331
7	0,8163	0,6781	1,0972
10,3	0,9614	0,7017	1,1721

Diámetro de los bocales	PESOS DE LOS MICELIOS DE «ASPERGILLUS NIGER. ADICIÓN DE TIERRA DE LA ARMUÑA (SALAMANCA): 2,5 GRAMOS POR BOCAL		
	Raza Boas-Poschenrieder.	Raza núm. 3 Instituto Cajal.	Raza N. R. R. L.-67
Centígramos.	*Gramos.*	*Gramos.*	*Gramos.*
3	0,6432	0,2243	0,5263
5,8	0,7013	0,2614	0,7614
7	0,7932	0,2831	0,8231
10,3	0,8654	0,2970	0,8742

En vista de tan sensibles variaciones en los pesos de los micelios (a los seis días de cultivo a 35°), se adoptan constantemente los bocales de 5,8 centímetros de diámetro exterior.

Inmediatamente después de la siembra los bocales pasan a estufa a 35°. se observan diariamente los cultivos y se anotan las particularidades del desarrollo de los velos miceliares. A los seis días los micelios son lavados cuidadosamente, con agua destilada, y, valiéndose de unas pinzas, son llevados sobre vidrios de reloj para desecarlos primero a 50°-60° (12-15 horas) y luego a 100° hasta peso constante. Es aconsejable proceder por triplicado o cuadruplicado, tomando el peso medio de los micelios obtenidos en cada ensayo.

En todo caso, anotamos los valores inicial y final del pH del medio de cultivo, para mejor interpretación de algunos resultados, que pueden parecer anómalos.

Constituyó para nosotros un serio problema el de la elección de un método de análisis químico del ácido fosfórico de las tierras, que nos diera cifras con las que pudiéramos relacionar los resultados obtenidos por vía biológica, mediante la técnica que acabamos de describir. En realidad se trataba nada menos que de hallar un proceso analítico capaz de reflejar otro biológico, finalidad que no ha sido lograda plenamente hasta ahora, pues sería evidente-

mente falsa la afirmación de que el fosfórico asimilable por el *Aspergillus niger*, en las condiciones de las experiencias planteadas habrá de ser precisamente el soluble en el agua, o en el citrato, o en ácidos débiles..., etc., y aún menos puede suponerse que la cifra de ácido fosfórico total, determinada por los métodos clásicos de solución en ácido nítrico, precipitación del fosfomolibdato..., etc., deban ser siempre correlativas a las de fosfórico asimilable por el *Aspergillus*. Ante esta situación pedimos sólo al método de análisis químico unos datos que permitan, en primera orientación, una discusión de resultados y elegimos una técnica colorimétrica que, al menos, hace rápidos y fáciles los ensayos en serie. Entre las numerosas que han sido preconizadas nos ha parecido que es aceptable la que A. P. S. Briggs aplica a la determinación del ácido fosfórico contenido en la sangre (12) introduciendo en ella las variaciones precisas para adaptarla al análisis de tierras. He aquí el método que seguimos:

En un pequeño matraz cónico echamos 2,500 grs. de tierra tamizada y, después, 6 c. c. de agua destilada y 2 c. c. de ácido tricloracético al 20 %. (Para tierras alcalinas o muy calizas pudiera convenir el empleo de mayores concentraciones de ácido tricloracético, hasta logar un pH final conveniente y aproximadamente constante para todos los casos determinando esa concentración mediante un ensayo previo.) No hemos abordado aún el estudio de este detalle, *que creemos importante*, de la técnica.

Tapando la boca del frasco agitamos vigorosamente durante varios segundos y después dejamos reposar durante diez minutos.

Filtramos el contenido del frasco, con la precaución de humedecer previamente el filtro en agua destilada y, a continación, lavamos el filtro con la cantidad suficiente de agua destilada para que el total del líquido filtrado sea de 21 c. c., para lograr lo cual, con exactitud, recogemos el filtrado en una pequeña probeta.

A este filtrado le añadimos los reactivos siguientes:

2 c. c. de solución de molibdato.

1 c. c. de solución de sulfato sódico, y

1. c. c. de solución de hidroquinona.

Hecho esto, aparece el color poco a poco, debiendo dejarse reposar por lo menos treinta minutos para su total aparición.

Para la preparación de los testigos «standard» añadimos a *n* c. c. de solución valorada de fosfato, en una probeta similar, graduada, los

2 c. c. de solución de molibdato.

1. c. c. de solución de sulfito sódico, y

1. c. c. de solución de hidroquinona.

Agua destilada hasta enrazar los 25 c. c.

Como en el caso anterior, fué necesario un mínimo de treinta minutos para la total aparición del color.

No es necesario añadir ácido tricloracético a los «standard» para igualarlos a las soluciones análisis, ya que, aunque es necesario mantener la acidez dentro de ciertos límites para la producción del color, esta acidez es proporcionada por los 2 c. c. de la solución de molibdato. Por otra parte, si la acidez total después de la adición de todos los reactivos fuese superior a 2 N la determinación sería errónea.

Las soluciones precisas son las siguientes:

Solución valorada de fosfato: contiene 0,4394 gramos de $K H_2 PO_4$ seco, por litro. Un centímetro cúbico equivale a 0,1 mgr. de fósfoto. Se añade cloroformo como preservador.

Solución de molibdato: 25 grs. de molibdato amónico se disuelven en 300 c. c. de agua destilada. A esta solución se le añaden 200 c. c. de agua acidulada con 75 c. c. de sulfúrico concentrado.

Solución de sulfito sódico: Contiene 20 % de sulfito. Deberá guardarse en frasco bien tapado o preparada en el momento en que debe ser usada.

Solución de hidroquinona: 0,5 grs. de hidroquinona son disueltos en 100 c. c. de agua; se añade una gota de ácido sulfúrico concentrado, para retardar la oxidación. 1 c. c. de esta disolución contiene un exceso de hidroquinona aun para tierras muy ricas en ácido fosfórico.

Comenzamos por comprobar que la intensidad de las coloraciones de la serie de disoluciones acuosas de fosfato puro cumplen con la ley de Beer, determinando previamente (con el espectofotómetro Pulfrich-Zeiss, que utilizamos para las colorimetrías) el filtro más conveniente que resultó ser el S-43. La serie de diluciones de fosfato monopotásico, preparadas a partir de la solución base, comprendían riquezas en fósforo de 0,16-0,18-0,20-0,22-0,24 y 0,26 miligramos que nos dieron de extinción iguales a 0,30-0,36-0,42-0,48-0,54 y 0,60, respectivamente. Por diluciones de las muestras y empleando cubas de 3-2, 1 ó 1/2 centímetros de espesor útil según las muestras de tierra, trabajamos siempre con coeficientes de extinción comprendidos entre los límites que acabamos de citar, o muy poco por bajo de límite inferior, en dos tierras sumamente pobres en $P_2 O_5$.

RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES

Estas se realizaron sobre 36 muestras de tierra de muy diversas procedencias. Por la limitación de tiempo impuesta por la duración del curso escolar no fué posible realizar análisis completos de estas tierras, ni siquiera la caracterización de ellas en lo que respecta a su análisis físico, pH y riqueza en carbonatos, pero estos datos están siendo determinados, con otros para completar el presente estudio, *que tiene el carácter de preliminar*. Las cifras de $P_2 O_5$ soluble en la dilución de ácido tricloracético, en las condiciones de la técnica analítica descrita más arriba, fueron las que figuran en el *Estado nº*. 2.

ESTADO NUM. 2

Procedencia de la muestra de tierra.	Dilución.	Espesor de la cubeta. — *Centímetros.*	Coeficiente de extinción.	Miligramos de P_2O_5 soluble, en 100 grs. de tierra.
Ontígola	1	3	0,20	3,86
Torre Monfort	1	3	0,22	4,00
Valdeorras	1	3	0,47	6,8
Lucena	1	3	0,64	8,4
Porriño	1	2	0,44	9,6
Moupalau	1	2	0,50	12,8
Melilla	1	1	0,32	15,2
Don Benito	1	1	0,33	15,6
Brunete	1	1	0,37	17,2
Las Rozas	1	1	0,44	19,2
Cuenca	1	1	0,48	20,4
Iguña	1	1	0,51	21,2
Dos Hermanas	1	1	0,54	22,0
Murcia	1	1	0,55	22,0
Manacor	1	1	0,58	22,8
Osuna	1	1	0,61	24,0
Córdoba	1	1	0,64	24,8
Llodio	1	0,5	0,35	32,4
Alcoy	1	0,5	0,38	34,4
Las Palmas	1	0,5	0,39	34,8
Vandellos	1	0,5	0,41	36,4
Montoro	1	0,5	0,42	36,8
Alcalá	1	0,5	0,44	38,0
Alcázar San Juan	1	0,5	0,46	39,2
Málaga	1	0,5	0,47	40,0
Ecija	1	0,5	0,49	41,2
Manzanares	1	0,5	0,51	42,4
Avila	1	0,5	0,55	44,0
Armuña	1	0,5	0,62	49,6
Vélez	1/2	0,5	0,36	64,4
Miranda	1/2	0,5	0,39	70,0
Villanueva	1/2	0,5	0,41	72,8
Toledo	1/2	0,5	0,45	77,2
Aranjuez	1/2	0,5	0,55	89,6
Madrid (Moncloa)	1/4	0,5	0,32	123,6
El Escorial	1/4	0,5	0,34	127,2

Como hemos indicado al tratar de las técnicas experimentales, no podemos pretender que las cifras representativas de las riquezas en P_2O_5, determinadas por el método empírico que hemos seguido, tengan otro valor que el de aspirar a que acusen diferencias de concentraciones de fosfórico fácilmente soluble, en las diferentes muestras. Seguramente tales cifras son muy inferiores a las de la riqueza de las tierras en P_2O_5 total, y no tenemos apoyo experimental alguno para tratar de establecer correlaciones entre estos datos analíticos y las proporciones de fosfórico asimilable por las plantas verdes. En realidad, debiéramos comparar los resultados de los métodos analítico y microbiológico (con *Aspergillus niger*) con los obtenidos por el método Mitscherlich o con los de sistemáticas y reiteradas experiencias en pleno campo,

ASPERGILLUS NIGER

Boas-Poschenrieder

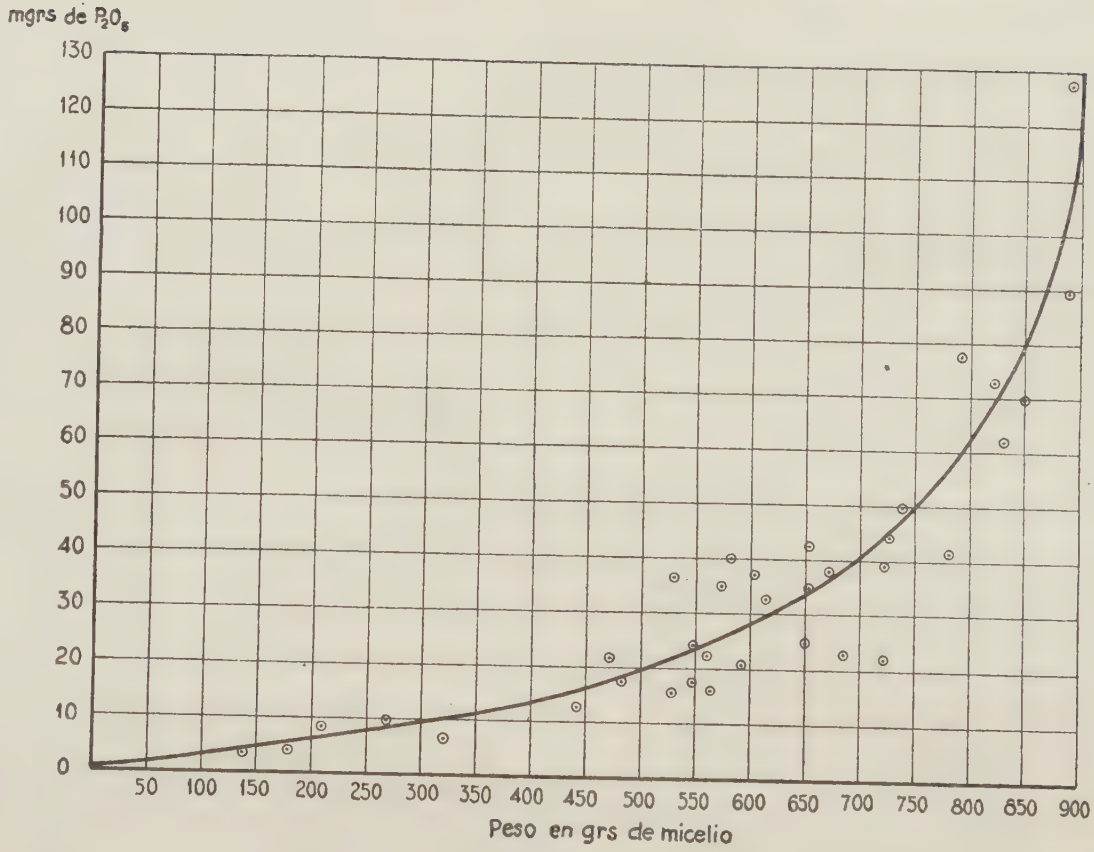


Gráfico 1

tarea irrealizable en el plazo de tiempo de que dispusimos, pero tarea que habrá de realizarse en la Cátedra de Microbiología de la Escuela Especial de Ingenieros Agrónomos, en la que este estudio, *preliminar*, servirá de primera orientación.

Los pesos de micelio seco de las tres razas de *Aspergillus niger* que utilizamos como «tests», siguiendo la técnica que describimos anteriormente, fueron las que figuran en el *Estado núm.* 3.

ESTADO NUM. 3

Peso de los micelios (secos a 100°) *de* Aspergillus niger *(razas Boas- Poschenrieder, Cajal núm.* 3 *y N. R. R. L.*-67) *logrados en seis días de cultivo,* 35° *C., sobre el medio basal adicionado de* 2,5 *gramos de cada una de las muestras de tierra* (ver técnica en páginas 269-270):

Procedencia de las muestras de tierra.	PESO DE LOS MICELIOS SECOS (A 100°) DE «ASPERGILLUS NIGER»		
	Raza Boas-Poschenrieder. — *Miligramos.*	Raza Instituto Cajal núm. 3. — *Miligramos.*	Raza N. R. R. L.-67. — *Miligramos.*
Ontígola	139	—	—
Torre Monfort	178,3 (*)	208	235
Valdeorras	320	—	—
Lucena	207,4	(*)	117,7
Porriño	267,9	203,5	427,1
Mompalau	442,4	150,4	219,5
Melilla	527,7 (*)	(*)	106,8 (*)
Don Benito	364	—	—
Brunete	483	—	—
Las Rozas	546	—	—
Cuenca	593	—	—
Iguña	473	—	—
Dos Hermanas	559,8	841,7	656,4
Murcia	720,7	502,5	333,6
Manacor	684	—	—
Córdoba	548	—	—
Llodio	649	—	—
Alcoy	615	—	—
Las Palmas	572	—	—
Vandellas	655	513,7	428,3
Osuna	548	—	—
Montoro	603	—	—
Alcalá	671	—	—
Alcázar de San Juan	721	—	—
Málaga	583,2	—	—
Ecija	783,3	—	—
Manzanares	651,1	—	—
Avila	725,7	686,3	352,2
Armuña	738,4	272,4	772,7
Vélez	830	—	—
Miranda	848	—	—
Villanueva	821	—	—
Toledo	792	—	—
Aranjuez	886	—	—
Madrid (La Moncloa)	801,3	766	1,036
El Escorial	892,6	694	1,076

(*) Casos de anormalidad. Ver discusión de estos casos.

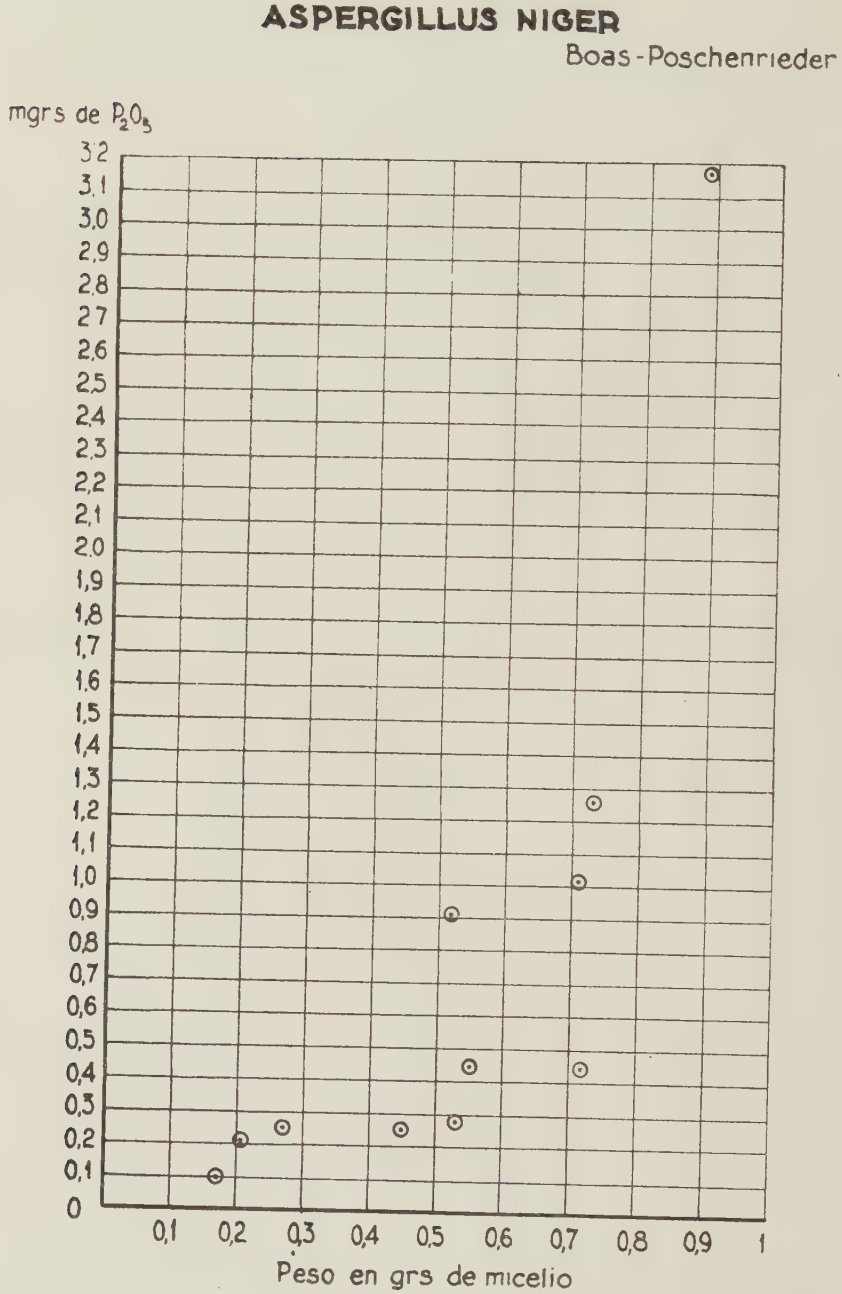

ASPERGILLUS NIGER
Boas-Poschenrieder
mgrs de P_2O_5
3,2
3,1
3,0
2,9
2,8
2,7
2,6
2,5
2,4
2,3
2,2
2,1
2,0
1,9
1,8
1,7
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1
Peso en grs de micelio

Gráfico 2

En una primera serie de ensayos no se logró desarrollo de micelio (o escasísima) con la raza Boas-Poschenrieder y tierra de Torre Monfort, con la raza *Instituto Cajal* núm. 3 y tierras de Melilla (Jezamen) y Lucena (Los Manaderos) y con la raza N. R. R. L.-67 y tierra de Melilla (Jezamen). Salvo para la tierra de Torre Monfort y raza *Boas-Poschenrieder*, la reiteración de los ensayos demostró que la ausencia de micelio no era accidental, pues el desarrollo siguió siendo siempre nulo o muy escaso (por ejemplo 18,3 miligramos de micelio seco, como máximo, con tierra de Melilla y raza *Instituto Cajal* núm. 3). *La adición de un exceso de fosfato (0,05 gramos por frasco) al medio basal el cultivo produjo en todos los casos un espléndido crecimiento de micelios.*

Parece interesante examinar más de cerca estos hechos, que muestran la existencia de factores específicos de la raza de *Aspergillus niger* y de la tierra, aunque los inhibihores sean superados por la presencia en el medio de una cierta dosis de ácido fosfórico, cuya carencia o escasez se pretendía hacer patente, de modo exclusivo. A continuación damos cuenta de las experiencias complementarias realizadas para tratar de aclarar los anormales resultados a los cuales venimos refiriéndonos.

A) *Caso, tierra de Torre Monfort y raza Boas-Poschenrieder.*

Después de cuatro ensayos sin lograr crecimiento ponderable de micelio, en una quinta experiencia obtuvimos un peso de 178,3 miligramos de micelio seco (cifra que figura en el Estado núm. 3), pero en dos ensayos más no obtuvimos resultados positivos. El pH del medio basal, después de añadidos los 2,5 gramos de tierra igual a 5,7, lo que indica que no era este el factor inhibidor y en vista de ello procedimos a estudiar experimentalmente las respuestas a adiciones crecientes de fosfato bisódico.

Estas respuestas fueron las siguientes:

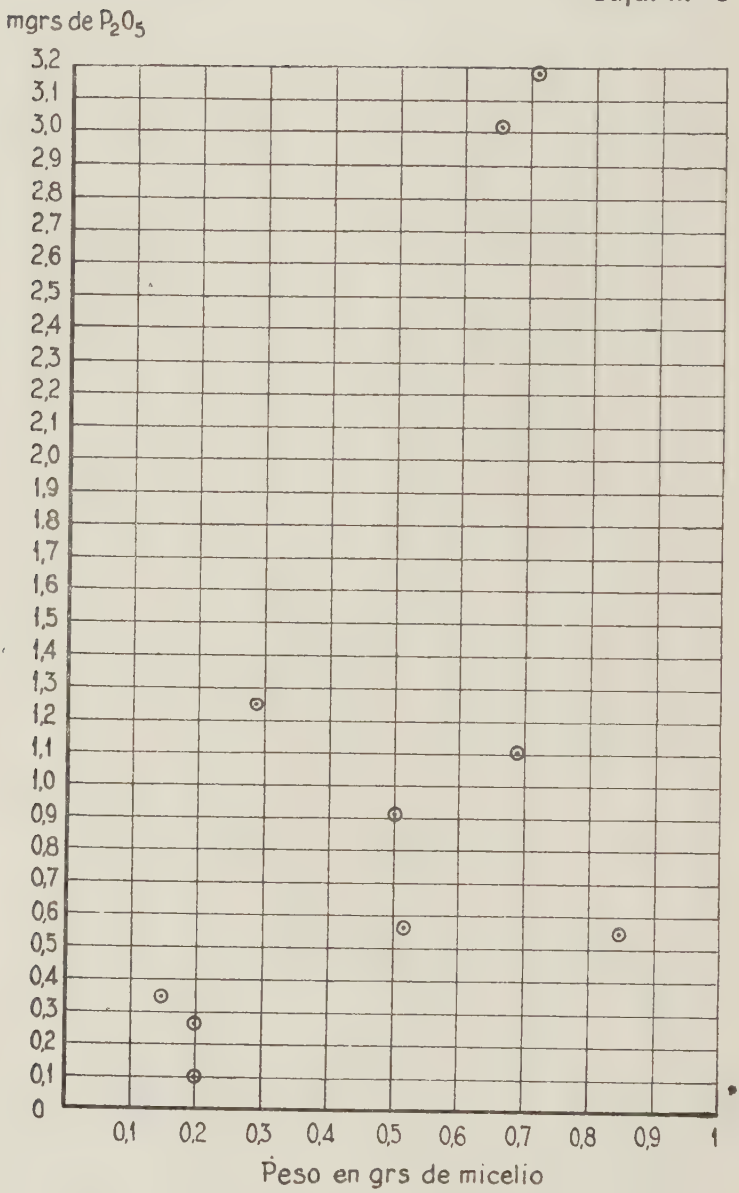
Cantidad de fosfato añadida a 30 c. c. de medio.	Peso del micelio seco a 100° — *Gramos.*
0,01 gramos	504,3
0,001 «	362,1
0,0001 »	263,9
0,00005 »	86,1
0,00001 »	0

y, haciendo más pequeñas las diferencias entre las cantidades de fosfato añadidas:

0,0001	216,7 gramos
0,00009	163,2 »
0,00007	151,2 »
0,00005	102,3 »
0,00003	62,1 »
0,00001	0 »

ASPERGILLUS NIGER

Cajal n.° 3



Nulos los desarrollos en tierras de Lucena y Melilla

Gráfico 3

Concentraciones de fosfato comprendidas entre 0,00003 y 0,00005 fueron suficientes para obviar la inhibición de crecimiento de los micelios, pero quedan sin explicación alguna los hechos de que con las razas *Instituto Cajal* núm. 3 y N. R. R. L.-67, se obtengan crecimientos sensibles de micelio y del que en una experiencia se haya logrado también con la raza Boas-Poschenrieder. Por el análisis colorimétrico la muestra de la tierra de Torre Monfort, figura entre las más pobres en P_2O_5 fácilmente soluble. Veremos más adelante que el método biológico proporciona los resultados más erróneos en las proximidades de los mínimos desarrollos de micelio.

B) *Caso, tierra de Los Manaderos (Lucena) y raza Instituto Cajal núm.* 3.

La tierra en cuestión es bastante caliza, pero el pH inicial del medio basal más tierra era de 6,2. Como para el caso anterior, bastan mínimas adiciones de fosfato disódico (que de ningún modo puede hacer disminuir la cifra de pH) para provocar discretos y aún notables crecimientos de micelio.

En ensayos sistemáticos el umbral del estímulo del P_2O_5 para el crecimiento de los micelios osciló entre 0,00005 grs. (peso de los micelios secos, en dos series de ensayos, 60,2 y 93,2 miligramos) y 0,00007 grs. de fosfato en 30 c. c. de medio (peso de los micelios secos, en dos series de ensayos, 68,1 y 83,1 miligramos). Como para el caso A se acusan particularidades específicas de las razas en los resultados del método microbiológico, ya que los *Aspergillus niger, Boas- Poschenrieder* y *N. R. R. L.*-67 dan sensibles aunque pequeños crecimientos de micelio, sin suplementos de fosfatos. También la tierra de Los Manaderos (Lucena) figura entre las más pobres en P_2O_5 soluble.

C) *Caso, tierra de Jezamen (Melilla) y raza Instituto Cajal núm.* 3.

El pH inicial del medio de cultivo después de añadir los 2,5 de tierra era igual a 5.1. Las respuestas a las adiciones de fosfato fueron en este caso impresionantes. Con 0,01 de fosfato disódico en los 30 c. c. de medio basal, el peso del micelio (seco a 100°) llegó a ser de 782,3 miligramos y el umbral de la respuesta se logró con dosis tan escasas como las de 0,000007 y 0,000008 gramos de fosfato por frasco (30 c. c. de líquido) con cuyas adiciones se obtuvieron pesos de micelio seco de 63, 4-81,2 y 106,1 miligramos.

La proporción de ácido fosfórico soluble es pequeña para esta tierra, pero algo mayor que las que acusan las tierras de Torre Monfort y Lucena. Es en este caso absolutamente anormal el peso de micelio de la raza *Boas-Poschenrieder*, pero, como en nuestro protocolo no figura la reiteración del ensayo, puede temerse un error experimental o de anotación.

D) *Caso, tierra de Jezamen (Melilla) y raza N. R. R. L.*-67.

No hubo crecimiento en dos ensayos, pero en tres posteriores obtuvimos

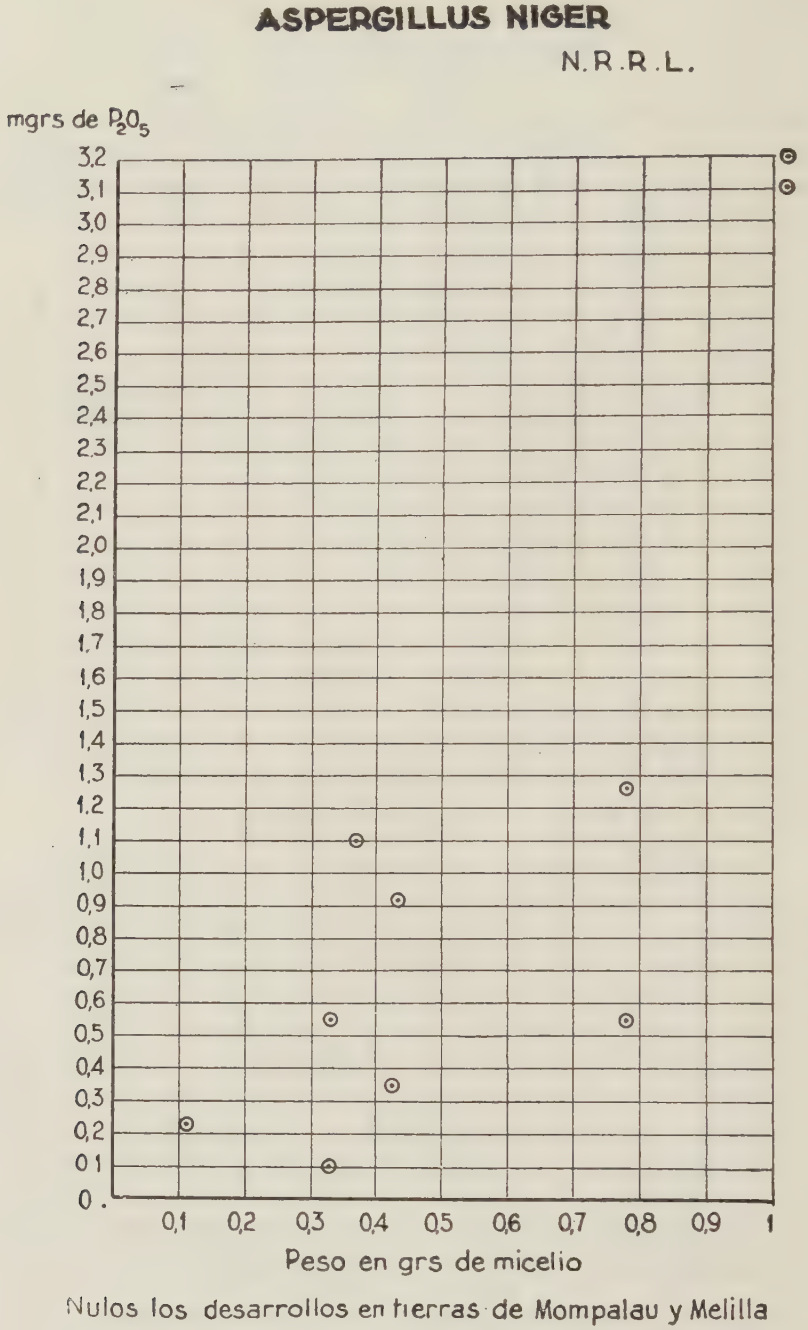

ASPERGILLUS NIGER
N.R.R.L.
mgrs de P_2O_5
3,2
3,1
3,0
2,9
2,8
2,7
2,6
2,5
2,4
2,3
2,2
2,1
2,0
1,9
1,8
1,7
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0.
0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1
Peso en grs de micelio
Nulos los desarrollos en tierras de Mompalau y Melilla

Gráfico 4

peso de micelio seco iguales a136,2-83,1 y 101,2 miligramos. (En el Estado núm. 3 figura la cifra media de estas tres experiencias.)

Estudio de la correlación entre los resultados de los análisis colorimétricos y los del método microbiológico de determinación del $P_2 O_5$ asimilable.

Para hacer el estudio de la correlación de datos obtenidos con la raza *Boas-Poschenrieder*, agrupamos las 36 muestras de tierra estudiadas en las siguientes clases:

Respecto a la cantidad de $P_2 O_5$, las clases abarcaron intervalos de 10 mgr. de peso existente en 100 gramos de tierra, a partir de O, quedando así todas las tierras agrupadas en 13 clases.

Con respecto al peso de micelio, agrupamos las muestras en clases que abarcan intervalos de 100 mgrs. de peso, recogidos a partir de 2,5 gramos de tierra, comenzando en la clase 100-200.

La ordenación y el método es el clásico seguido en todo estudio biométrico.

Sobre ordenadas tomamos las clases peso de micelio y sobre abcisas cantidades de $P_2 O_5$.

Como medias auxiliares tomamos:

$$Gx = 30 — 40$$
$$Gy = 500 — 600.$$

La nomenclatura es:

f = frecuencia.
v = clase.
n = número de muestras.
d' = desviaciónV — G.

Y las cantidades que hemos de obtener:

$$W = \frac{\Sigma f (V - G)}{n} = \text{término de corrección de la media.}$$

$$4 = \sqrt{\frac{\Sigma f d'^2}{n} - w^2} = \text{desviación típica.}$$

$$r = \left[\frac{\Sigma (d' x\ d' y)}{n} - w_x w_y \right] \times \frac{1}{\sigma_x \sigma_y} = \text{coeficiente de correlación.}$$

En el cuadro adjunto se encuentran ordenadas y calculados los valores de las cantidades antes pedidas y que son:

$$w_x = \frac{5}{8}$$

$$w_y = \frac{4}{9}$$

$$\sigma_x = 3{,}33$$
$$\sigma_y = 1{,}95$$
$$r = 0{,}65$$

Y, además, el error probable del coeficiente de correlición es:

$$E_r = \pm \frac{0{,}6745\ (1 - r^2)}{\sqrt{n}}.$$

En el caso estudiado tiene un valor numérico

$$E_r = \pm\ 0{,}0648.$$

Vamos a interpretar el coeficiente de correlación, siguiendo las reglas dadas por King, el cual relacionándolo con el error probable llega a las siguientes conclusiones:

I. Casos en que el error probable es relativamente grande:
a) Si r es menor que el error probable no existe correlación.
b) Si r excede en más de seis veces el error probable existe correlación.

II. Casos en que el error probable es relativamente pequeño.
a) Si r es menor que 0,3 no existe correlación marcada.
b) Si r es mayor que 0,5 existe correlación.

En este caso existe correlación puesto que el error probable es 0,0648, diez veces menor que el coeficiente de correlación, y ésta, como vemos, es positiva, o sea que a un crecimiento de fosfórico en el suelo corresponde un crecimiento de peso de micelio.

Veamos ahora, gráficamente, qué relación liga a los pesos de micelio con las proporciones de fosfórico soluble que resultan de los análisis por el método colorimétrico.

Tomamos sobre el eje de las X los pesos de micelio y sobre el eje de las Y proporciones, en miligramos, de P_2O_5 determinadas por el método colorimétrico; de esta forma obtenemos una distribución de puntos que indicará la marcha correlativa de ambas magnitudes.

Sobre el gráfico de los pesos de micelio de *Aspergillus niger*, raza *Boas-Poschenrieder* (gráfico núm 1), hemos dibujado la curva ideal en la que, para ciertos valores de $P_2 O_5$ intermedios, la proporcionalidad viene acusada por una línea logarítmica.

Esto al fin y al cabo es lo natural y lógico, ya que así ocurre con todos los seres, en los cuales, al estudiar su crecimiento en función de las variaciones de un elemento componente de los que forman el complejo de la nutrición, al principio y ser éste el más escaso, el crecimiento es proporcional al elemento estudiado; en cambio al aumentar éste puede ocurrir que proporcionalmente falten otros elementos, sucediendo a partir de un cierto límite que la adición de este compuesto no verifica prácticamente acción alguna.

En el caso estudiado del fosfórico al aumentar la concentración de $P_2 O_5$ en el medio nutritivo el hongo toma mayor cantidad, cosa que observan Smith y Dryburgh, quienes, analizando la composición del micelio, observan que aumenta el tanto por ciento de $P_2 O_5$ al aumentar el peso de éste.

La curva dibujada en el gráfico núm. 1 es del tipo

$$X = K_1 e^{\frac{-K_2}{y}}$$

Tipo que aparece muy frecuentemente en el ajuste matemático de un hecho biológico.

El estudio comparativo de la adaptación para este estudio de las tres razas aparece en los gráficos 2, 3 y 4, donde están los resultados de análogas experimentaciones hechas con 12 tierras iguales. Vemos que únicamente en la raza *Boas-Poschenrieder* parecen ajustarse sus puntos a la curva biológica, siendo por ello la recomendada para este tipo de investigaciones.

Las otras razas, indudablemente, no responden tan bien a estas experimentaciones por ser sensibles a las interferencias de otros elementos contenidos en las tierras, como lo prueba el hecho de que, al experimentar con ellas en soluciones puras del líquido nutritivo con cantidades crecientes de fosfato sódico, la curva biológica aparece claramente, según se observa en los gráficos 5 y 6, correspondientes a la raza *Boas-Poschenrieder* y N. R.R. L., obtenidas substituyendo en la técnica seguida la tierra adicionada al líquido nutricio, por cantidades de fosfórico, añadidas bajo la forma de fosfato disódico.

En cuanto al desarrollo del micelio obtenemos que para la raza *Boas-Poschenrieder* a partir de una cantidad 0,0001 gr. de fosfórico existen pequeñas manchas de esporas en el velo que no existen cuando la cantidad de fosfórico es menor.

Mientras que en las razas Cajal 5 y N. R. R. L. se producen esporas en e velo a cantidades de fosfórico mayores que 0,001 gr.

Notamos que la raza *Boas-Poschenrieder* necesita menos y es más sen-

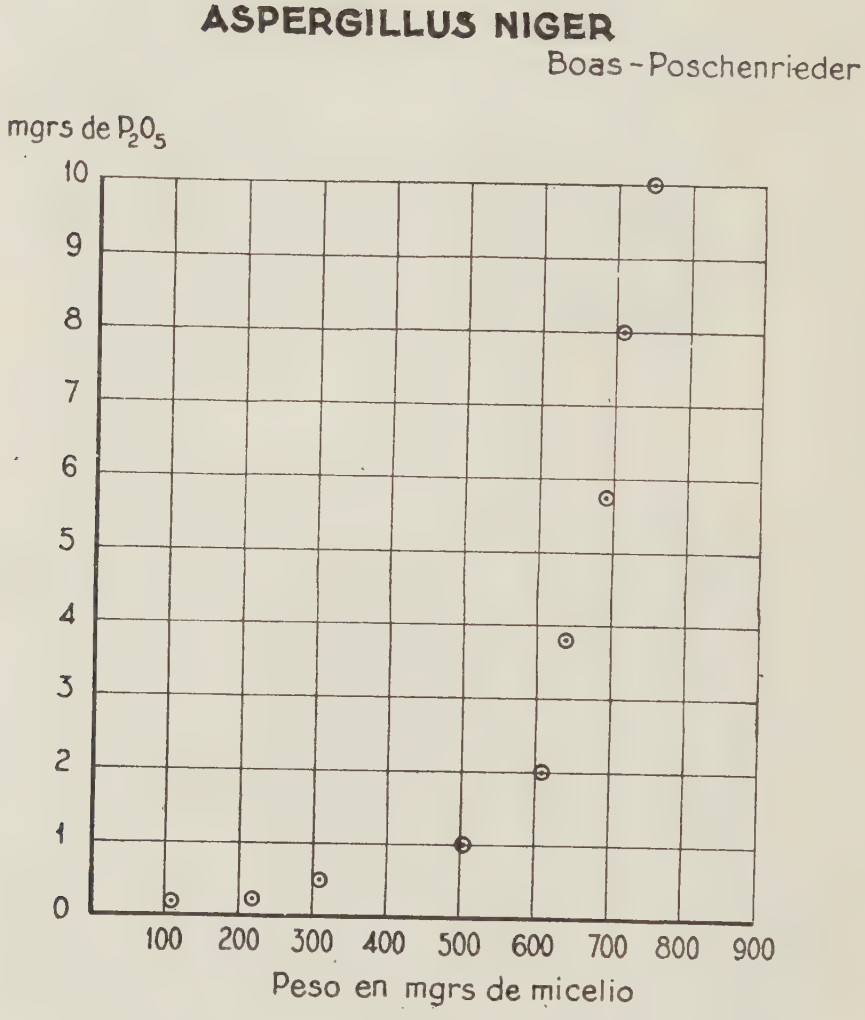

ASPERGILLUS NIGER
Boas - Poschenrieder
mgrs de P_2O_5
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
Peso en mgrs de micelio

Gráfico 5

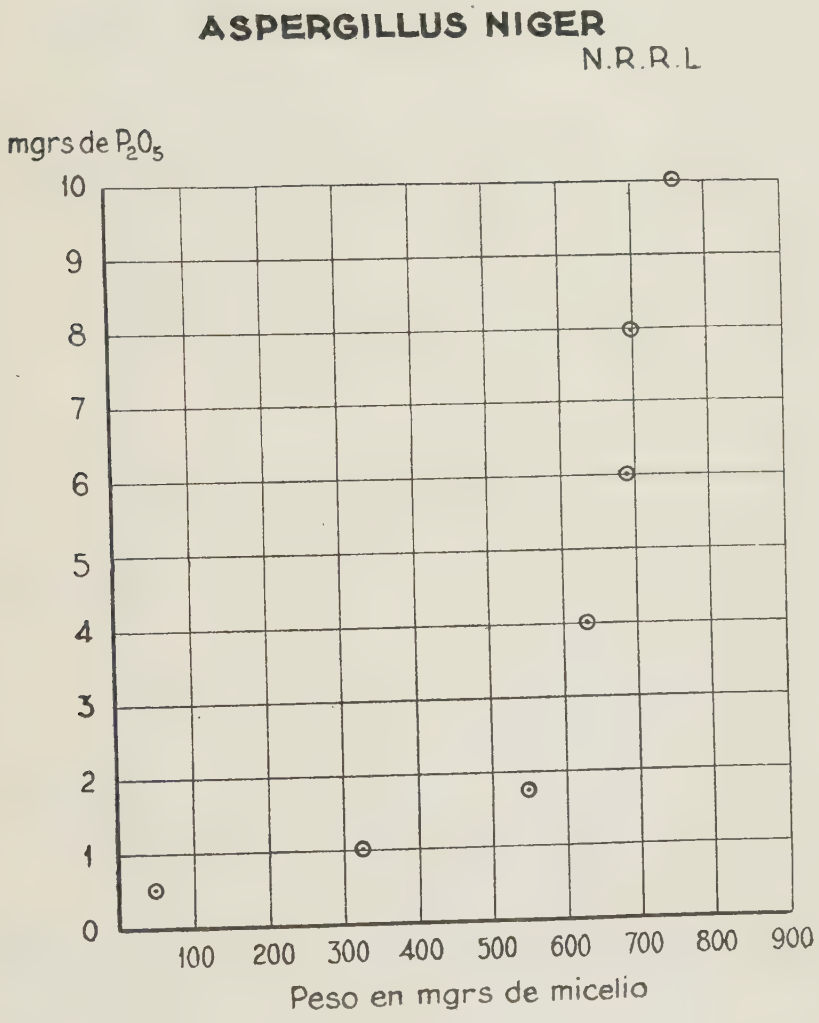

ASPERGILLUS NIGER
N.R.R.L
mgrs de P_2O_5
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
Peso en mgrs de micelio

Grafico 6

sible al fosfórico que la Cajal 3 y N. R. R. L.; un hecho más nos afianzó en la bondad de esta raza, como antes se indicó, en uno de los matraces de líquido de cultivo, de unos tres litros, de vidrio Jena, apareció una infección de *Aspergillus niger* que comprobamos era de la raza *Boas-Poschenrieder*, dejado durante más de mes y medio se recogió una cantidad de micelioque, desecada y pesada, dió 2,6437 gr. como el diámetro del frasco, de forma globoidal, era de 20 c/m., no podemos comparar la cantidad de fosfórico que necesitaba ese micelio con las obtenidas anteriormente, pues hemos visto la gran influencia que el diámetro de la vasija tiene en el crecimiento, lo que, como antes expusimos, nos motiva a creer este hecho que la cantidad de fosfórico exigua que existía en el agua destilada de la solución hizo posible el comienzo del desarrollo y entonces los jugos del *Aspergillus* hicieron solubles fosfatos que indudablemente estaban en el vidrio.

En los ejemplos obtenidos con cantidades de fosfórico conocidas las curvas aparecen de la misma forma que la encontrada para el caso de las tierras, lo que nos confirma la idea de una relación de la forma

$$X = K_1 \cdot e^{\frac{-K_2}{y}}$$

Hasta ahora habíamos seguido los métodos aplicados por diferentes investigadores, pero la especialidad de nuestras enseñanzas nos ponían frente a la realidad de un hecho concreto, por otra parte era cierto que la peculiaridad propia de cada tierra influía, pues aunque suministrábamos todos los alimentos necesarios para su desarrollo, excepto el fosfórico, podía haber una interacción que falsease los resultados.

Al agricultor no le interesa, ni le dice nada, un dato de un tanto por ciento, que poseen en fosfórico las tierras que labra, ¿es poco, es mucho? La escasez le indicará una beneficiosa labor de abonado, pero sería mucho mejor que esa cifra empírica respondiera a una realidad, cual es la cifra que al agricultor le interesa, una sobre todo, al aumento de cosecha que le va a producir un abonado, esto es lo que modestamente tratamos de encontrar, estando en curso las investigaciones solamente indicamos el método a seguir.

El hongo como un ser vivo responderá a un mayor alimento de una manera análoga a las plantas, luego si nosotros tenemos en un frasco la solución nutritiva con la tierra y una escala de frascos en los que se ha añadido a la solución desprovista de fosfórico, cantidades conocidas de éste en forma asimilable, la variación de peso de micelio nos indicará la respuesta dada en el crecimiento del hongo a la mayor disponibilidad de fosfórico. El equipo encimático del hongo es más potente que el de las plantas superiores y diferente, esto en primer término no es obstáculo, pues, respondiendo el hongo en el crecimiento a la curva logarítmica que se encuentra en las plantas superiores, Mitscherlich (1).

Para ver la variación sufrida por el peso del micelio, al añadir cantidades de fosfórico, y comprobar que seguía una trayectoría de forma análoga a la encontrada, se hicieron ensayos añadiendo a los 2,5 grs. de tierrr cantidades de fosfato disódico resultado que aporece en el Estado siguiente:

Peso de los micelios (secos a 100°) de Aspergillus niger logrados a los seis días de cultivo a 35° añadiendo cantidades de fosfato disódico y 2,5 gramos de tierra de Porriño al medio de cultivo:

Cantidad en mgr. de P_2O_5	Raza Boas-Poschenrieder. — *Miligramos.*	Raza Instituto Cajal núm. 3 — *Miligramos.*	Raza N. R. R. L.-67 — *Miligramos.*
0,00	267,9	203,7	427,1
0,01	306,7	—	—
0,02	347,2	303,3	467,8
0,03	381,3	—	—
0,04	374,6	319,6	431,3
0,05	402,1	—	—
0,06	417,6	427,1	512,0
0,07	421,4	—	—
0,08	401,2	531,2	613,4
0,09	436,0	—	—
0,10	468,5	672,7	717,3
0,20	506,0	—	—
0,30	597,1	—	—
0,40	691,5	706,3	836,0
0,50	764,2	—	—
0,60	716,7	718,0	907,0
0,70	700,6	—	—
0,80	736,0	836,1	961,2
0,90	781,6	—	—
1,00	806,3	871,3	962,4
1,50	871,3	—	—
2,00	863,2	971,0	1082,3
3,00	906,3	983,6	1117,4
4,00	945,3	973,2	1221,0
5,00	867,2	986,3	1263,7
6,00	960,0	—	—
8,00	903,8	—	—
10,00	987,3	1163,1	1003,0
20,00	967,4	908,3	1321,2
30,00	1034,5	—	—
40,00	943,8	1193,2	1163,1
50,00	1127,0	—	—

solamente nos queda pasar de una a otra, pero el problema no lo hemos abordado desde el punto de vista teórico, sino que nos hemos desligado en principio en absoluto; al tiempo que recogemos los datos de variación de peso de micelio, en el campo de donde se ha cogido la muestra hemos acotado parcelas a las que se la ha añadido cantidades de superfosfato comercial conocidas, e individualmente y para cada planta cultivada se hará una corre-

lación para luego comprobarla en diferentes tierras y una vez obtenido un dato práctico, al año siguiente repetir para luego dar un resultado numérico.

Como muestra de la diferente manera de comportarse el hongo en su crecimiento, damos a continuación los datos obtenidos, añadiendo al líquido nutricio 0,2 mgr. de $P_2 O_5$. Llamando coeficiente P.

$$P = \frac{K - K_1}{K_1}$$

Siendo K peso del micelio del hongo en la solución con 0,2 mgr. de $P_2 O_5$ y 2,5 gr. de tierra, K_1 peso del micelio del hongo en la solución con sólo los 2,5 gr. de tierra.

Localidad tierra	Sin adición	Con 0,2 mgr. de $P_2 O_5$	Coeficiente.
El Escorial	901,3	916,1	0,016
Moncloa	873,2	878,3	0,005
La Armuña	761,3	801,7	0,052
Avila	702,1	862,3	0,22
Arroyo Valle	723,1	731,8	0,011
Dos Hermanas	559,8	683,1	0,22
Vandellas	528,4	701,3	0,32
Lucena	207,4	681,3	2,28
Mompalan	432,1	701,3	0,62
Torre Monfort	63,8	383	0,02

Coeficientes que, aún alejados de la realidad, responden bien a las peculiaridades propias observadas en cada localidad y que vemos discrepan notablemente del dato tanto por ciento observado antes.

Es evidente que estos coeficientes, multiplicados por 100, nos dan el tanto por ciento de incremento de cosecha en cuanto al aumento del peso de micelio se refiere.

Creemos que, perfeccionando este método con los resultados que se obtengan en el campo y la creación de tablas, se podrá llegar a que el agricultor pueda predecir el aumento de cosecha que le proporcionará la adición de un superfosfato a su tierra. Esperemos poder publicar otro modesto trabajo en el que demos cuentas de los resultados de los estudios hoy en vías de realización que estamos llevando.

BIBLIOGRAFIA

(1) MITSCHERLICH, E. A. und F. DURING.—*Das Liebigsche Gesetz vom Minimum und das Wirkungsgesetz der Waschstums faktoren. Sehriften d. Königsb. Gel. Ges, D. J. Jahr (1926) Verlag Max Niemeyer, Halle (Saale).*

— Uber die Konstanten in wirkungsgesetze der waschstumsfaktoren. Schriften d. Königsb. Gel. Ges, F. Jahr (1928), H. 2, S. 32, Verlag Max Niemeyer, Halle (Saale).

MITSCHERLICH, E. A.—*Zur Ausschattung eines systematischen Fehlers bei Feldversuchen. Schriften d. Königsb. Gel. Ges. S. Jahr (1929). 22. S. Verlag Max Niemeyer, Halle (Saale).*

— Die verarbeitung landwirtschaftlicher und anderer Biologischer versuchsergebnisse. Schriften d. Königsb. Gel. Ges. Z. Jahr (1934). 31. S. Verlag Max Niemeyer, Hall (Saale).

— Untersuchungen über die Pflanzenphysiologischen. Wert von chemischen und biologischen Laboratoriumsmethoden Zur Bestimmung des Düngerbedürfnisses des Bodens. Schriften d. Königsb. Gel Ges. Z. Jahr (1933) 22. S. Verlag Max Niemeyer, Halle (Saale).

— Studien über die Ernahrung der Pflanze und die Ertragsbildung bei verschiedener Dungung. Schriften d. Königsh. Gel. Ges. E. Jahr (1935) Verlag Max Niemeyer, Halle (Saale).

(2) NIKLAS H. POSCHENRIEDER, G. und TRISCHLER, S.—1933.—*Urteile und erfahrungen über die Verwendbarkeit und Brauchbarkeit der Aspergillus-Kalimethode und deren beurteilung nach dem Stand der bisherigen Forschungsergebnisse Ztschr. Pflanzenern. Dung. und Bodenk.* 12: 3 pp. 109-130.

NIKLAS, H. und TOURSD, O.—*Ergebnisse aus dem gefässversuch von Mitscherlich der keimpflanzen methode von Neubauer der Laktat und der Aspergillus methode bezuglich der Phosphorsäure ergebnisse von ingesamt 1264 Böden.—Boden kultur u. Pflanzenernahr.* **24**. 1941. pp. 310. *Ref. en Z. f. Bakt. Abt. II Bd.* 105 *Hefr.* 23/24 pp. 476-.1943.

(3) — Ver referencia anterior.

(4) VARALLAY, G.—1934.—*Determination of the effect of K and P by comparative methode with Aspergillus. Ztschr. Pflanzener.*

(5) SMITH, A. M.—*Some observations on the Aspergillus niger method from the Trans. of the Third Int. Cong. of Soil Science.* Vol I. 1935, pp. 170-173.

— Further studies on the Aspergillus niger-Method of examining soils. Ref. from the Journ. of the Soc. of Chemical Industry L. V. n.º 31, pp. 217-21.

SMITH, A. M. and DYBURGH.—*The examination of soil by means of Aspergillus niger.—Repr. from the Journ. of The Soc. of Chemical Industry Ag.* 10. 1934. L. III, n.º 32, pp. 250-54.

SMITH, F. B. BROWM PEAND MILLAR H. C.—1935.—*The examination of phosphorus by Aspergillus niger and Cunninghamella Sp. Jour. Amer. Soc. Agron.* 27: 12-988-1000

(6) MEHLICH, A., TRUOG, E. and FRED, E. B.—1933.—*The Aspergillus niger Method of measuring available potassium in soil.—Soil Science,* **35**. 259.

(7) SCHLOTS, F. E., SMITH, F. B. and BROWN, P. E.—1932.—*Aspergillus niger as an indicator of available phosphorus in the soil.—Proc Acad. Sciences.* 1931. **38**. pp. 303-307

(8) STOK JUEGEN.—1933.—*Kulturversuche mit Aspergillus niger als Indikator für die Dunger bedürftnigkeit. Bot. Arch.* **35**, 1-76.

— 1936.—*Die mikrobiologischen Methoden zur Bestimmug des Dungerbedürfnisses der Boden. Schweiz. Land. Monatsh.* **14**. 169-179.

(9) MOOERS, C. A.—*An evaluation of the Neubauer and the Cunnighamella and Aspergillus niger methods for the determination of the fertilizer needs of a soil.—Soil-Sci.* **46**. 211.

(10) MULDER, E. G.—*Ueber den kupfermangel als ursache der urbarmachungskrankheit.—Separata de Zeits. Pflanzenkrankheiten (Pflanzen pathologie) und Pflanzenchutz* 5º.—*Jahrg.* 1940. Heft 5. pp. 230-264.

— On the use of microorganisms in measuring a deficiency of copper, magnesium and molybdenium in soils.—Ref. from Antony van Leeuwenhock, **6**, 1939-1940. pp. 99-109.

SMITH, J. and MULDER, E. G.—*Magnesium deficiency as the cause of injury in cereals.*

— Overdruck in Medeelingen van. Landbou whoegschool Deel, **46**.—*Verhandling,* 3. pp. 1-43.

(11) WAKSMAN, S. A.—*Microbiological analisis of soil as an index of soil fertility III.*

— *Influence of fertilization on numbers of microorganisms in the soil.*—*Soil Science*, 14. 321-346. 1922.

WAKSMAN, S. A. and KARUNAKER, V. D.—*Microbiological Analisis of soil as an index of soil fertility.*—*Nitrogen Fixation and manite descomposition. Soil Science.* 17. pp. 379-394. 1924.

(12) A. P. S. BRIGGS.—*The Journal of Biological Chemistry.* — Vol LIII. — 1922. pp. 13-16.

ACTAS DE LA SOCIEDAD

ACTA DE LA SESION CELEBRADA POR LA SECCION DE MADRID DE LA SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS ESPAÑOLES EL DIA 6 DE OCTUBRE DE 1947

En el edificio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas se verificó, en la tarde del día 6 de octubre de 1947, bajo la Presidencia de D. Juan Marcilla, la reunión mensual ordinaria.

Abierta la sesión por el Sr. Presidente, el Secretario presentó el primer número de la Revista de la Sociedad, solicitando de todos los socios que envíen a la secretaría relación de revistas y personas con las que desearían que se verificase intercambio de la Revista.

Después, dió cuenta del viaje efectuado por varios Socios al IV Congreso Internacional de Microbiología de Copenhague, en donde se presentaron varias comunicaciones.

Finalmente, el Sr. Urgoiti mostró la información cinematográfica que captó del Congreso.

Sin más asuntos que tratar, levantó el Sr. Presidente la sesión. Lo que certifico en Madrid, a 7 de octubre de 1947..

ACTA DE LA SESION CELEBRADA POR LA SECCION DE MADRID DE LA SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS ESPAÑOLES, EL DIA 3 DE NOVIEMBRE DE 1947

En el edificio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, tuvo lugar, el día 3 de noviembre de 1947, la reunión mensual. Fué presidida por D. Juan Marcilla.

Abierta la sesión por el Sr. Presidente, el Sr. Fraile Ovejero leyó una comunicación sobre el núcleo de las células de levadura.

A continuación, D. Juan Marcilla leyó un trabajo que ha hecho en colaboración con la Srta. Pilar Aznar, sobre «Algunas observaciones sobre la determinación del ácido nicotínico en las levaduras».

Por último, fueron admitidos como nuevos socios D. Manuel Piera Fló y D. Arsenio Fraile Ovejero, presentados por D. Juan Marcilla y el Secretario que suscribe.

Y no habiendo más asuntos que tratar, el Sr. Presidente declaró levantada la sesión.

De lo cual levanto acta, y, como Secretario, lo certifico en Madrid, a 3 de noviembre de 1947.

ACTA DE LA SESION CELEBRADA POR LA SECCION DE MADRID DE LA SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS ESPAÑOLES, EL DIA 1 DE DICIEMBRE DE 1947

Bajo la Presidencia de D. Juan Marcilla, en el edificio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, sito en Medinaceli , 4, celebró la Sociedad de Microbiólogos Españoles la sesión Científica correspondiente al mes de diciembre en el día 1.º de dicho mes.

Abierta la sesión, D. Ricardo Salaya leyó las notas que tiene recopiladas para un trabajo sobre «Ideas existentes acerca de la causa del Cólera, antes de la época de los trabajos del Doctor Ferrán». Después de esta lectura, se acordó rogar a los socios que aporten todos los datos de que dispongan acerca de la actuación del Doctor Ferrán y de los comentarios que se han escrito sobre su obra.

El Sr. Marcilla propuso que la bibliografía que se publica en la Revista tenga una numeración correlatica, además de las iniciales que indican la Biblioteca que posee el escrito reseñado; esta numeración facilitará el servicio de fotocopia.

Se aprueba, igualmente, otra propuesta del Sr. Marcilla en el sentido de que pueden leerse comunicaciones originales de personas ajenas a la Sociedad, siempre que sean avaladas por socios de la misma.

La Asamblea general de la Sociedad se celebrará en el mes de abril de 1948, y, en su aspecto científico, se compondrá de la exposición de temas generales, a cargo de personas previamente señaladas, y la lectura de comunicaciones que sobre cualquier materia presenten los socios.

Se nombra representante de la Sociedad, en Barcelona, al P. Juan Puiggrós, con el encargo de organizar aquella delegación local.

El Sr. Tesorero notifica el procedimiento que se ha elegido para la recaudación de las cuotas sociales, consiste en ingresar su importe en la cuenta que a nombre de la Sociedad de Microbiólogos Españoles se ha abierto en la Central del Banco Hispano Americano. Al recibir el Tesorero el resguardo correspondiente, enviará al socio el recibo de la cuota.

El Secretario da cuenta de la visita del microbiólogo argentino Profesor Luis C. Verna, quien, por haber permanecido en Madrid tan sólo un día, no pudo asistir a la reunión de la Sociedad, como hubiera sido el deseo de ésta.

Fueron admitidos, como nuevos socios, los señores siguientes: D. Julio Hidalgo Armengot, D. Jesús Martín de Frutos y D. Nicolás Martínez Balmisa, todos ellos Veterinarios, que fueron presentados por D. Vicente Callao Fabregat y D. Francisco Cabrero. Igualmente fueron presentados, por los señores García Bengoa y Colomo, D. Santos Ovejero del Agua y D. Guillermo González de Canales.

Y sin más asuntos que tratar, se levantó la sesión, de la que certifico, como Secretario de la Sociedad, en Madrid, fesha ut supra.

SECRETARIA

Cuarto Congreso Internacional de Microbiología en Copenhague

En los días 20 al 26 del pasado mes de julio se celebró en la ciudad de Copenhague el cuarto Congreso Internacional de Microbiología, organizado por la Asociación Internacional de Microbiólogos. El Congreso estaba encabezado por la Presidencia Honoraria del Prof. Bordet (Bruselas), que fué Presidente de la reunión de 1930; del Prof. Faber (Copenhague); del Dr. Rivers (Nueva York), que fué Presidente de la reunión de 1939, y con la Presidencia efectiva del Dr. T. H. Madsen (Copenhague). La organización fué excelente, por lo que debemos felicitar a sus directivos, dado el ingente trabajo que esta clase de reuniones aporta a los que tienen la responsabilidad de las mismas en todas las ramas de la organización, y en particular a los Secretarios, por lo que haremos mención del Secretario General de la Asociación Internacional Dr. St. John-Brooks, y del que lo fué del Congreso, doctor M. Bjœrneboe.

Las secciones que componían el Congreso fueron las siguientes: La sección 1.ª, Microbiología General, se dedicó principalmente al estudio de los antibióticos y de las sustancias para el desarrollo de los gérmenes. Fué presidida esta sección por Sir Alexander Fleming (Inglaterra) y el Dr. Trefouel (Francia). Presentaron comunicaciones en esta sección dos miembros de nuestra Sociedad: el Dr. Nájera Angulo, que habló de la acción de la penicilina sobre el *Spirochaeta hispánica*, in vitro e in vivo, y el Prof. Bustinza, que informó de la acción de la penicilina sobre la germinación de las semillas de plantas superiores.

La sección 2.ª se ocupó de la Bacteriología médica y veterinaria, bajo la Presidencia del Dr. Ramon (Francia). Intervinieron en esta sección los miembros de nuestra Sociedad, Dr. Gastón de Iriarte, con una comunicación acerca de la vacunoterapia en la tuberculosis experimental, y Dres. Ibáñez González y Martínez Mata, con una comunicación sobre el antígeno capsular de los microorganismos del género *Brucella*.

La 3.ª sección, dedicada al estudio de los virus y de las enfermedades por ellos causadas, fué presidida por el Dr. Kling (Suecia), y en ella leyó su comunicación sobre «algunos hechos observados durante el cultivo del virus de la poliomielitis incubado en huevos», el Prof. Sanz Ibáñez.

La sección 4.ª, dedicada a la Serología e Inmunología, fué presidida por el Prof. Thjœtta (Noruega); la 5.ª, dedicada a la variación y mutación en los microorganismos, fué presidida por el Prof. Blakeslee (Estados Unidos de Norteamérica); la 6.ª, dedicada a la Fitopatología y la Micología, fué presidida por la profesora Westerdijk (Holanda); la sección 7.ª, Microbiología del

suelo y del agua, por el Prof. Waksman (Estados Unidos de Norteamérica); la 8.ª, que se ocupó de la Microbiología de los productos lácteos y de los demás alimentos, fué presidida por el Dr. Burri (Suiza).

En la sección 9.ª, dedicada a la Microbiología industrial y a las fermentaciones, tanto alcohólicas como a las de otro tipo, presidida por el Prof. Kluyver (Holanda) y el Dr. Claussen (Dinamarca), leyó una comunicación sobre «Nuevas materias primas para la producción de levadura pienso», el Presidente de nuestra Sociedad, D. Juan Marcilla.

Fuera de las reuniones de las secciones mencionadas, pronunciaron conferencias con carácter de sesiones generales, los siguientes profesores: doctor Werkman (Estados Unidos de Norteamérica), sobre asimilación del anhídrido carbónico; Dr. Bawden (Inglaterra), sobre los virus en general; Prof. Winge (Dinamarca), sobre la levadura en la Genética moderna, y el Dr. Waksman (Estados Unidos de Norteamérica), sobre los antibióticos y la vida.

Se acordó, en principio, que el próximo Congreso Internacional de Microbiología se celebrase en el Brasil, en el año 1950.

Como agradable complemento al Congreso se visitaron importantes laboratorios e industrias relacionadas con la Microbiología, así como los museos y lugares artísticos e históricos de Copenhague y de la isla en que está situada la ciudad.

El grupo de microbiólogos españoles que concurrieron al Congreso, formado por los Sres. Marcilla, Sanz Ibáñez, Bustinza, Socías, Vilas, P. Puiggrós, Gastón de Iriarte, Urgoiti, Nájera Angulo, Ibáñez González y Callao, tuvieron la satisfacción de poder entregar personalmente, al Prof. Bessemans (Gante), su diploma de miembro de honor de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, en un acto celebrado en los locales de la legación de España en Copenhague.

TERCERA LISTA DE SEÑORES SOCIOS DE LA SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS ESPAÑOLES

PIERA FLO (MANUEL).—*Dr. en Med.* - Domicilio particular: Rambla de Cataluña, 85, pral. 2.ª Barcelona.

FRAILE OVEJERO (ARSENIO).—*Dr en Far.* - Domicilio particular: Avenida del Valle, 16. Madrid.

HIDALGO ARMENGOT (JULIO).—*Veterinario.* - Domicilio particular: Alcalá, 84. Madrid.

MARTIN DE FRUTOS (JESÚS).—*Veterinario.* - Domicilio particular: Ibiza, núm. 25. Madrid.

MARTINEZ BALMISA (NICOLÁS).—*Veterinario.* - Domicilio particular: Basilio Paraíso, 22.—Madrid.

GONZALEZ DE CANALES (GUILLERMO).—*Veterinario.* - Domicilio particular: Alberto Aguilera, 4º. Madrid.

OVEJERO DEL AGUA (SANTOS).—*Veterinario.* - *Facultad de Veterinaria.* León.

OTRAS ACTIVIDADES DE LA SOCIEDAD

SECCION DE BIBLIOGRAFIA

I. En nuestro número anterior publicamos la ficha bibliográfica del libro de D. Pedro Herce, titulado *El pH y los potenciales redox(Teoría y mediciones)*, publicado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas. Hoy queremos dar una idea algo más amplia de lo que es la obra de referencia, con lo que inauguramos un nuevo capítulo de nuestra Revista, consistente en comentar y difundir las publicaciones que de nuestras especialidades, escritas en España, lleguen a nuestras manos.

En el caso que nos ocupa cedemos la palabra al autor del prólogo del libro, Presidente del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, que con su acostumbrada maestría analiza la obra en todos sus aspectos y se expresa del siguiente modo:

«Fiel al propósito de poner a disposición de sus investigadores y del público científico en general trabajos que faciliten su labor ofreciéndoles nuevas técnicas o recopilando ordenada y metódicamente, con anexión de sus perfeccionamientos, las de constante aplicación, el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas aumenta la serie de sus publicaciones monográficas con la obra que ahora aparece bajo el título *El pH y los potenciales redox*.

»La avalora con su pericia el competentísimo Inspector del Consejo Superior Agronómico, D. Pedro Herce Fernández, prestigioso profesor de Química analítica en la Escuela Especial de Ingenieros Agrónomos y colaborador, muy valioso, de este Instituto en la Escuela de Fitopatología de Madrid, hasta su ascenso a Consejero Inspector General.»

«Antecedente y base de esta publicación ha sido un folleto, editado hace varios años por el Sr. Herce, sobre *Fundamentos de Acidimetría*; pero la obra que ahora sale a la luz dista mucho de ser una nueva edición de aquel ensayo, ya que el presente trabajo se inscribe en círculo de mayor amplitud y alcanza más dilatados horizontes, no sólo al desarrollar extensa y profundamente materias y conceptos entonces superficialmente tratados, sino al incorporarle, atento siempre el autor a cualquier avance de la técnica en las disciplinas de su especial competencia, cuantas innovaciones y progresos tales como el electrodo de vidrio, la aplicación de la válvula electrónica a la medida de fuerzas electromotrices, o de los potenciales redox a la Química analítica, han

aparecido en esta peculiar parcela del análisis químico que tan solícita y competentemente cultiva.»

Obra de un técnico, enfrentado con un problema, no pretende en ningún momento contornearlo siguiendo la línea de mínimo esfuerzo que ofrece la curva de nivel; ni coronarlo mediante una ascensión cómoda por su suave trazado, pero fatigosa por su dilatado desarrollo; sino que, seguro de su fortaleza y preparación para dominarlo, lo aborda decididamente por su máxima pendiente con la confianza de quien, por tener contempladas y conocidas desde la cumbre todas las perspectivas, hasta las más escondidas y recónditas, camina entre las múltiples dificultades del recorrido con la certeza de haber elegido el camino más breve y adecuado.

Sólo así puede lograrse, como lo ha conseguido el autor, recorrer con paso firme, sin vacilaciones ni tanteos, el trayecto que, iniciándose con el estudio de los fundamentos básicos y generales de la acidimetría, llega al de los potenciales redox, reuniendo con perfecto orden, claridad y concisión cuantos aspectos, en relación con tan importantes y nada fáciles materias, aparecen dispersos en revistas y publicaciones diversas, constituyendo en conjunto una obra que, al ser sometida al autorizado juicio del ilustre Académico de Ciencias y Director de la Escuela de Ingenieros Agrónomos, D. Juan Marcilla, ha sido conceptuada como de especialísimo interés para cuantos trabajan en acidimetría y potenciales de óxido-reducción, y calificada como una condensación de los actuales conocimientos sobre estas cuestiones, sin precedente igualmente fundamentado.

Elogiosa opinión que viene a confirmar con plena autoridad, la que directamente he formado de que, con la publicación de este trabajo, el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas rinde un servicio al progreso científico agrícola del país.»

Como ampliación a lo antes dicho por el Sr. Presidente del Instituto de Investigaciones Agronómicas, añadiremos que la obra está dividida en las tres partes que a continuación se indica:

1.º Generalidades. 2.º Determinación del pH, que a su vez comprende: *a)* Fundamento del método eléctrico. *b)* Acidímetros potenciométricos. *c)* Fundamento del método colorimétrico. *d)* Críticas de los métodos: eléctrico y colorimétrico, y 3.º Potenciales de óxido-reducción.

* * *

II. *Elementos de Bacteriología*, por M. Frobisher; traducido de la tercera edición por el Dr. G. Estellés (1947).

Comentamos en esta sección la mencionada obra por que si bien es el original extranjero contiene, sobre todo al final de la obra, y con el título

Notas del traductor, unas ampliaciones al texto que son de verdadero interés y actualidad, es obra de indudable utilidad para el principiante en los estudios microbiológicos, ya que a través de sus numerosos capítulos se tratan muy diversas e interesantes cuestiones de la especialidad y constituye un verdadero programa de los conocimientos actuales y sus diversas aplicaciones prácticas al estudio de los seres microscópicos.

Por las características citadas y por su extensa bibliografía se hace asimismo interesante para el microbiólogo en general y más si a esto se añade su evidente modernidad.

* * *

A continuación damos la tercera lista de publicaciones que tienen a su disposición los señores Socios por intermedio de la Secretaría y servicio de fotocopias.

Las iniciales que van al final de cada nota corresponden al Centro en que se encuentra la publicación en ellas indicada, y cuya interpretación se da siempre al comienzo de las listas. Si aquéllas pertenecieran a bibliotecas personales de los señores Socios se indicará, siempre al final de la nota y entre paréntesis, el nombre, apellidos y dirección del propietario de la publicación. Si existieran en varias bibliotecas la misma publicación se citarán todas, y sólo en el caso de ser excesivamente numerosas las referencias se hará selección de las mismas.

L. M. M. = Laboratorio Municipal de Madrid.
E. I. A. = Escuela de Ingenieros Agrónomos.
I. M. G. A. = Instituto de Microbiología General y Aplicada.
E. Q. A. = Estación de Química Agrícola.
I. E. = Instituto de Edafología.
I. C. = Instituto Cajal.
E. F. A. M. = Estación de Fitopatología Agrícola de Madrid.

LIBROS

BARTON-WRIGHT, E. C.—*Practical Methods for the Microbiological assay of the vita. min B. complex and essential amino-acids.* Londres, Ashe Laboratories, Ltd. 58, c. grab-int. 9. L. M. M.

DÉRIBÉRÉ, MAURICE.—*Les Applications Industrielles du pH.*—Tercera edición. 1946. X. 367, c. grab. int. 116, París.

ARTICULOS DE REVISTAS (1)

103
MELLON (RALPH, R.).—*The Polyphasic Potencies of the Bacterial Cell; Its General Biologic and Chemotherapeutic Significance.—Journal of Bacteriology*, págs. 1-27, vol. 44, núm. 1 july, 1942. I. E.

104
LAMANNA (CARL).—*Relation of Maximum Growth Temperature to Resistance to Heat.—Journal of Bacteriology*, Págs. 29-35, vol. 44, núm. 1 july, 1942. I. E.

105
DIENES (L.).—*The Significance of the Large Bodies and the Development of L Type of Colonies in Bacterial Cultures.—Journal of Bacteriology*, págs. 37-73, vol. 44, núm.1 july 1942. I. E.

106
YOUNG (RAYMOND, M.) AND JAMES (L. H.).—*Action of Intestinal Microörganisms on Ascorbic Acid.—Journal of Bacteriology*, págs. 75-84, vol. 44, núm. 1 july 1942. I. E.

107
RENTSCHLER (HARVEY ,C.) AND NAGY (RUDOLPH).—*Bactericidal Action of Ultraviolet Radiation on Air-Borne Organisms.—Journal of Bacteriology*, págs. 85-94, vol. 44, núm. 1 july 1942. I. E.

108
MUIR (R. D.), SHAMLEFFER (V. J.) AND JONES (R. L.).—*Studies Pertaining to the Antibacterial Activity of Sulfathiazole and its Methyl Derivative.—Journal of Bacteriology*, págs. 95-110, vol. 44, núm. 1 july 1942. I. E.

109
GEE (LYNN, L.) AND SARLES (W. B.).—*The Disinfection of Trout Eggs Contaminated with Bacterium Salmonicida.—Journal of Bacteriology*, págs, 111-126, vol. 44, núm. 1 july 1942. I. E.

110
YOUMANS (GUY, P.) AND DELVES (EDNA).—*The Effect of Inorganic Salts on the Production of Small Colony Variants by Staphilococcus Aureus.—Journal of Bacteriology*, págs. 127-136, vol. 44, núm 1 july 1942. I. E.

111
BOTTCHER (ELIZABETH, J.) AND CONN (H. J.).—*A Medium for the Rapid Cultivation of Soil Actinomycetes.—Journal of Bacteriology*, págs. 137-137, vol. 44, núm. 1 july 1942. I. E.

112
STERGES (A. J.).—*Simplified Method for the Preparation of Silica Gels.—Journal of Bacteriology*, págs. 138-138, vol. 44, núm. 1 july 1942. I. E.

113
DREA (W. F.).—*Growth of Small Numbers of Tubercle Bacilli, H37, in Long's Liquid Synthetic Medium and Some Interfering Factors.—Journal of Bacteriology*, págs. 149-161, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

114
BURDON (KENNETH, L.), STOKES (JULIA, C.) AND KIMBROUGH (CECIL, E.).—*Studies of the Common Aaerobic Spore-Forming Bacilli. II Fermentation Reactions in Agar Butt-Slants.—Journal of Bacteriology*, págs. 163-168, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

115
STONE (R. W.), FENSKE (M. R.) AND WHITE (A. G. C.).—*Bacteria Attacking Petroleum and Oil Fractions.—Journal of Bacteriology*, págs. 169-178, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

---

(1) Para facilitar el servicio de fotocopia, los artículos de revista que se reseñan, van precedidos del número de nuestro fichero que habrá de citarse al solicitar el servicio.

116
CLIFTON (C. E.).—*The Utilization of Amino Acids and Related Compounds by* Clostridium tetani.—*Journal of Bacteriology*, págs. 179-183, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

117
LOCHHEAD (A. G.).—*Growth Factor Requirements of* Bacillus larvae.—*Journal of Bacteriology*, págs. 185-189, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

118
McFADDEN (D. B.), WEAVER (R. H.) AND SCHERAGO (M.).—*The Sanitary Significance of Pectin-Fermenting, Lactose-Fermenting, Gram-Negative, Non-Spore-Forming Bacteria in Water.—Journal of Bacteriology*, págs. 191-199, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

119
RICHMOND (JULIUS, J.) AND REED (C. I.).—*The Effect of Staphylococcus Enterotoxin on Isolated Rabbit Gut Segments.—Journal of Bacteriology*, págs. 201-205, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

120
EVANS (ALICE, C.).—*Technique for the Determination of the Sensitivity of a Strain of Streptococcus to Bacteriophage of Type A, B, C or D.—Journal of Bacteriology*, págs. 207-209, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

121
EVANS (ALICE, C.) AND SOCKRIDER (ELSIE, M.).—*Another Serologic Type of Streptococci Bacteriophage.—Journal of Bacteriology*, págs. 211-214, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

122
NUNHEIMER (T. D.) AND FABIAN (F. W.).—*Respiratory Studies of the Micrococci.—Journal of Bacteriology*, págs. 215-232, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

123
PEPPLER (H. J.).—*A Bacteriological Comparison between Synthetic and Natural Glycerol.—Journal of Bacteriology*, págs. 233-236, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

124
CANTOR (A.), SHELANSKI (H. A.) AND WILLARD (C. Y.).—*A Microscopic Alkali-Solubility Test for the Identification of Gonococcus Colonies.—Journal of Bacteriology*, págs. 237-240, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

125
BURNET (F. M.) AND FARIS (DOROTHY, D.).—*The Technique of Quantitative Chorioallantoic Virus Titration.—Journal of Bacteriology*, págs. 241-248, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

126
TURNER (WILLIAM, J.), KRESS (BERNARD, H.) AND HARRISON (NORMAN, B.). *Alpha- Naphtol Color Test for Dihydroxyacetone and Hydroxymaleic Acid.—Journal of Bacteriology*, págs. 249-250, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

127
WILSON (J. B.) AND WILSON (P. W.).—*Hydrogen in the Metabolism of Azobacter.—Journal of Bacteriology*, págs. 250-251, vol. 44, núm. 2 august 1942. I. E.

128
SOBIN (BEN) AND STAHLY (GRANT, L.).—*The Isolation and Absorption Spectrum Maxima of Bacterial Carotenoid Pigments.—Journal of Bacteriology*, págs. 265-267, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

129
Mac LEOD (COLIN, M.) AND MIRICK (GEORGE S.).—*Quantitative Determination of the Bacteriostatic Effect of the Sulfonamide Drugs on Pneumococci.—Journal of Bacteriology*, págs. 277-287, vol. 44, núm 3 september 1942. I. E.

130
EDWARDS (P. R.) AND BRUNER (D. W.).—*A Description of an Anusual Salmonella Type with Special Reference to the Evolution of Salmonella Species.—Journal of Bacteriology*, págs. 289-300, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

131
KING (JOHN W.) AND RETTGER (LEO F.).—*Gram-Positive Non-Sporulating Anaerobic Rod-Shaped Bacteria of the Intestinal Tract. III. Intra-and Extra-Group Relationships.—Journal of Bacteriology*, págs. 301-316, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

132
UMBREIT (W. W.) AND ANDERSON (T. F.).—*A Study of* Thiobacillus thiooxidans *with the Electron Microscope.—Journal of Bacteriology*, págs. 317-320, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

133
RANH (OTTO) AND RICHARDSON (G. L.).—*Oxygen Demand and Oxygen Supply.—Journal of Bacteriology*, págs. 321-332, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

134
WOOD (A. J.) AND GUNSALUS (I. C.).—*The Production of Active Resting Cells of Streptococci.—Journal of Bacteriology*, págs. 333-341, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

135
LOCHHEAD (A. G.) AND LANDERKIN (G. B.).—*Nutrilite Requirements of Osmophilic Yeasts.—Journal of Bacteriology*, págs. 343-351, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

136
CONN (H. J.).—*Validity of the Genus Alcaligenes.—Journal of Bacteriology*, págs. 353-360, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

137
MUDD (STUART), POLEVITZKY (KATHERINE), ANDERSON (THOMAS, F.) AND KAST (CLARA, C.).—*Bacterial Morphology as Shown by the Electron Microscope. III. Cell-Wall and Protoplasm in a Strain of Fusobacterium.—Journal of Bacteriology*, págs. 361-366, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

138
TARKOW (L.), FELLERS (C. R.) AND LEVINE (A. S.).—*Relative Inhibition of Microorganisms by Glucose and Sucrose Sirups.—Journal of Bacteriology*, págs. 367-372, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

139
WAKSMAN (SELMAN, A.) AND WOODRUFF (H. BOYD.).—*Selective Antibiotic Action of Various Substances of Microbial Origin.—Journal of Bacteriology*, págs. 373-384, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

140
SAZ (ARTHUR, K.) AND BERNHEIM (FREDERICK).—*The Effect of Benzoic Acid and Related Compounds on the Growth of Certain Mycobacteria.—Journal of Bacteriology*, págs. 385-386, vol. 44, núm. 3 september 1942. I. E.

141
STEINHAUS (EDWARD, A.).—*The Microbial Flora of the Rocky Mountain Wood Tick,* Dermacentor andersoni *Stiles.—Journal of Bacteriology*, págs. 397-404, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

142
STANIER (R. Y.).—*A Note on Elasticotaxis, in Myxobacteria.—Journal of Bacteriology*, págs. 405-412, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

143
DUNHAM (WOLCOTT, B.) AND Mc NEAL (WARD, J.).—*Culture on the Chick Chorioallantois as a Test of Inactivation of Vaccinia Virus.—Journal of Bacteriology*, págs. 413-424, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

144
REED (R. W.).—*Nitrate, Nitrite and Indole Reactions of Gas Gangrene Anaerobes.—Journal of Bacteriology*, págs. 425-442, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

145
ELROD (R. P.).—*The Erwinia-Coliform Relationship.—Journal of Bacteriology*, págs. 433-440, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

146
MRAK (E. M.), PHAFF (H. J.), VAUGHN (R. H.) AND HANSEN (H. H.).—*Yeasts Occurring in Souring Figs.—Journal of Bacteriology*, págs. 441-450, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

147
DOUDOROFF (MICHAEL).—*Studies on the Luminous Bacteria. I. Nutritional Requirements of Some Species, with Special Reference to Methionine.—Journal of Bacteriology*, págs. 451-459, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

148
DOUDOROFF (MICHAEL).—*Studies on the Luminous Bacteria. II. Some observations on the Anaerobic Metabolism of Facultatively Anaerobic Species.—Journal of Bacteriology*, págs. 461-467, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

149
KOCHOLATY (WALTER).—*Cultural Characteristics of Penicillium Notatum in Relation to the Production of Antibacterial Substance. Indication of the Dual Nature of the Antibacterial Substance.—Journal of Bacteriology*, págs. 469-477, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

150
BOHONAS (NESTOR), HUTCHINGS (B. L.) AND PETERSON (W. H.).—*Pyridoxine Nutrition of Lacti Acid Bacteria. — Journal of Bacteriology*,págs. 479-485, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

151
VAUGHN (REESE H.) AND LEVINE (MAX).—*Differentiation of the «Intermediate» Coli-like Bacteria.—Journal of Bacteriology*, págs. 487-505, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

152
VERA (HARRIETTE, D.).—*Rapid Demonstration of Hemolysis due to Anaerobes.—Journal of Bacteriology*, pág. 507-508, vol. 44, núm. 4 october 1942. I. E.

153
SCHATTENBERG (HERBERT, J.) AND HARRIS (WILLIAM, H.).—Chromobacterium violaceum, *Var. Manilae as a Pathogenic Microorganism.—Journal of Bacteriology*, págs. 509-521, vol. 44, núm. 5 november 1942. I. E.

154
GUNSALUS (I. C.) AND WOOD (A. J.).—*The Dehydrogenation of Alcohols by Streptococci of Group B.—Journal of Bacteriology*, págs. 523-528, vol. 44, núm. 5 nocember 1942. I. E.

155
CLARK (FRANCIS E.) AND MITCHELL (ROLAND B.).—*Cell Inclusions of Globiforme and Related Type of Soil Microorganisms.—Journal of Bacteriology*, págs. 529-532, vol. 44, núm. 5 november 1942. I. E.

156
BERNHEIM (FREDERICK).—*The Effect of Various Substances on the Oxygen Uptake of Blastomyces Dermatiditis.—Journal of Bacteriology*, págs. 533-539, vol. 44, núm. 5 november 1942. I. E.

157
STUART (L. S.) AND GARESLINE (HARRY E.).—*Bacteriological Studies on the Natural Fermentation Process of Preparing Egg White for Drying.—Journal of Bacteriology*, págs. 541-549, vol. 44, núm. 5 november 1942. I. E.

158
GOWEN (JOHN W.) AND LINCOLN (RALPH E.).—*A Test for Sexual Fusion in Bacteria.—Journal of Bacteriology*, págs. 551-554, vol. 44 ,núm. 5 november 1942. I. E.

159
STANIER (R. Y.).—*Agar-Decomposing Strains of the Actinomyces Coelicolar Species-Group.—Journal of Bacteriology*, págs. 555-570, vol. 44, núm. 5 november 1942. I. E.

160
WELSCH (MAURICE).—*Bacteriostatic and Bacteriolytic Properties of Actinomycetes.—Journal of Bacteriology*, págs. 571-588, vol. 44, núm. 5 november 1942. I. E.

161
DURFEE (OLIVE).—*Classification of* 110 *Strains of* Staphylococcus aureus.—*Journal of Bacteriology*, págs. 589-595, vol. 44, núm. 5 november 1942. I. E.

162
KING (R. L.) AND BEAMS (H. W.).—*Ultracentrifugation and Cytology of* Spirillum volutans.—*Journal of Bacteriology*, págs. 597-609, vol. 44, núm. 5 november 1942. I. E.

163

LAMANNA (CARL).—*The Status of* Bacillus subtilis, *Including a Note on the Separation of Precipitinogens from Bacterial Spores.—Journal of Bacteriology*, págs. 611-617, vol. 44, núm. 5 november 1942. I. E.

164

MARSHALL (MAX S.) AND NORDBY (HELEN P.).—*Anaerobic Plates.—Journal of Bacteriology*, págs. 619-621, vol. 44, núm. 5 november 1942. I. E.

165

STUART (L. S.) AND GORESLINE (HARRY E.).—*Studies of Bacteria from Fermenting Egg White and the Production of Pure Culture Fermentations.—Journal of Bacteriology*, págs. 625-632, vol. 44, núm. 6 december 1942. I. E.

166

ELROD (R. P.) AND BRAUN (ARMIN C.).—Pseudomonas aeruginosa: *Its Rôle as a Plant Pathogen.—Journal of Bacteriology*, págs. 633-645, vol. 44, núm. 6 december 1942. I. E.

167

SAGE (DOROTHY N.) AND SPAULDING (E. H.).—*A Study of Two Atypical Strains of* E. typhosa.—*Journal of Bacteriology*, págs. 647-651, vol. 44, núm. 6 december 1942. I. E.

168

ROBERTS (JAMES L.) AND BALDWIN (I. L.).—*Spore Formation by* Bacillus subtilis *in Peptone Solutions Altered by Treatment with Activated Charcoal.—Journal of Bacteriology*, págs. 653-659, vol. 44, núm. 6 december 1942. I. E.

169

NUTINI (LEO G.) AND KRELSE (CORNELIUS W.).—*The Toxic Effect of Splenic Extracts on* Streptococcus hemolyticus.—*Journal of Bacteriology*, págs. 661-666, vol 44, núm. 6 december 1942. I. E.

170

YEGIAN (DIRAN) AND BAISDEN (LOUIS).—*Factors Affecting the Beading of the Tubercle Bacillus Stained by the Ziehl-Neelsen Technique.—Journal of Bacteriology*, págs. 667-672, vol. 44, núm. 6 december 1942. I. E.

171

KULP (W. L.) AND BORDEN (D. G.).—*Further Studies on* Proteus hydrophilus, *the Etiological Agent in «Red Leg» Disease of Frogs.—Journal of Bacteriology*, págs. 673-685, vol. 44, núm. 6 december 1942. I. E.

172

SPECK (M. L.) AND STARK (C. N.).—*The Gas Ratio and Some Correlated Distinguishing Properties of Bacteria of the Genus Proteus.—Journal of Bacteriology*, págs. 687-701, vol. 44, núm. 6 december 1942. I. E.

173

JOHNSON (FRANK H.), CARVER (CLIFFORD M.) AND HARRYMAN (W. K.).—*Luminous Bacterial Auxanograms in Relation to Heavy Metals and Narcotics, Self-Photographed in Color.—Journal of Bacteriology*, págs. 703-715, vol. 44, núm. 6 december 1942. I. E.

174

KOHN (HENRY I.) AND HARRIS (JEROME S.).—*Methionine Made an Essential Growth Factor by Cultivation of* E. coli *in the Presence of Methionine and Sulfanilamide. Journal of Bacteriology*, págs. 717-718, vol. 44, núm. 6 december 1942. I. E.

175

BORNSTEIN (S.).—*A Practical Suggestion for the Serological Type Determination of Salmonella Organisms.—Journal of Bacteriology*, págs. 719-720, vol. 44, núm. 6 december 1942. I. E.

176

WAKSMAN (SELMAN A.).—*The Microbe as a Biological System.—Journal of Bacteriology*, pág. 1, vol. 45, núm. 1 january 1943. I. E.

177

STUART (C. A.), WHEELER (K. M.), RUSTIGIAN (ROBERT) AND ZIMMERMAN (ALICE).—*Biochemical and Antigenic Relationships of the Paracolon Bacteria.—Journal of Bacteriology*, págs. 101-119, vol, 45, núm. 2 february 1943. I. E.

178
WALLICK (H.) AND STUART (C. A.).—*Antigenic Relationships of* Escherichia coli *Isolated from One Individual.—Journal of Bacteriology*, págs. 121-126, vol. 45, núm. 2 february 1943. I. E.

179
JOHNSON (EDWIN A.) AND RETTGER (LEO R.).—*A Comparative Study of the Nutritional Requirements of* Salmonella typhosa, Salmonella pullorum *and* Salmonella gallinarum.—*Journal of Bacteriology*, págs. 127-135, vol 45, núm. 2 february 1943. I. E.

180
DOWNS (CORNELIA M.).—*The Effect of Bactericidal Agents on Gram-Negative Cocci.—Journal of Bacteriology*, págs. 137-142, vol. 45, núm. 2 february 1943. I. E.

181
MORTON (HARRY E.) AND ANDERSON (THOMAS F.).—*The Morphology of* Leptospira icterohemorrhagiae *and* L. canicola *as Revealed by the Electron Microscope.—Journal of Bacteriology*, págs. 143-146, vol. 45, núm. 2 february 1943. I. E.

182
HARRIS (ALBERT H.).—*Experiments with Collodion Sacs on Inhibition of Bacterial Growth* in Vitro.—*Journal of Bacteriology*, págs. 147-154, vol. 45, núm. 2 february 1942. I. E.

183
GUNSALUS (I. C.) AND SHERMAN (J. M.).—*The Fermentation of Glycerol by Streptococci.—Journal of Bacteriology*, págs. 155-162, vol. 45, núm. 2 february 1943. I. E.

184
BAISDEN (LOUIS) AND YEGIAM (DIRAN).—*The Destruction of Acid-Fastness of the Tubercle Bacillus by an Autolytic Process.—Journal of Bacteriology*, págs. 163-166, vol. 45, núm. 2 february 1943. I. E.

185
PACKCHANIAN (ARDZROONY).—*An Animal Board for Rabbits, Monkeys, and other Laboratory Animals.—Journal of Bacteriology*, págs. 167-176, vol. 45, núm. 2 february 1943. I. E.

186
BRONSON (L. H.) AND PARKER (R. F.).—*The Inactivation of the Virus of Infectious Myxomatosis by Heat.—Journal of Bacteriology*, págs. 177-181, vol. 45, núm. 2 february 1943. I. E.

187
UNDERKOFLER (L. A.), BANTZ (A. C.) AND PETERSON (W. H.).—*Growth Factors for Bacteria. XIV. Growth Requirements of* Acetobacter suboxydans.—*Journal of Bacteriology*, págs. 183-190, vol. 45, núm. 2 february 1943. I. E.

188
LEONIAN (LEON H.) AND GREENE LILLY (VIRGIL),—*The «Unknown Factor» in the Growth of* Saccharomyces cerevisial.—*Journal of Bacteriology*, págs. 191-192, vol. 45, núm. 2 february 1943. I. E.

189
SEELER (ALBERT O.), GRAESSLE (OTTO) AND DUSENBERY (EDWINA D.).—*The Effect of Para-Aminobenzoic Acid on the Chemotherapeutic Activity of the Sulphonamides in Lymphogranuloma Venereum and in Duck Malaria.—Journal of Bacteriology*, págs. 191-209, vol. 45, núm. 3 march 1943. I. E.

190
HERSHEY (A. D.) AND BRONFENBRENNER (J.).—*Stepwise Liberation of Poorly Sorbed Bacteriophages.—Journal of Bacteriology*, págs. 211-218, vol. 45, núm. 3 march 1943. I. E.

191
WILSON (P. W.) AND LIND (C. J.).—*Carbon Monoxide Inhibition of Azotobacter in Microrespiration Experiments.—Journal of Bacteriology*, págs. 219-232, vol. 45, núm. 3 march 1943. I. E.

192
WAKSMAN (SELMAN A.), HORNING (ELIZABETH S.) AND SPENCER (ERNEST L.). *Two Antagonistic Fungi,* Aspergillus fumigatus *and* Aspergillus clavatus, *and Their Antibiotic Substances.—Journal of Bacteriology*, págs. 233-248, vol. 45, núm. 3 march 1943. I. E.

193
SHERMAN (J. M.), NIVEN (C. F.) Jr., and SMILEY (K. L.).—Streptococcus salivarius *and Other Non-hemolytic Streptococci of the Human Throat.—Journal of Bacteriology*, págs. 249-263, vol. 45, núm. 3 march 1943. I. E.

194
KATZIN (LEONARD I.), SANDHOLZER (LESLIE A.) and STRONG (MARY E.).—*Application of the Decimal Reduction Time Principle to a Study of the Resistance of Coliform Bacteria to Pasteurization.—Journal of Bacteriology*, págs. 265-272, vol. 45, núm. 3 march 1943. I. E.

195
FELSENFELD (O.) and HEILBRUNN (G.).—*Two Artificial «O» Forms of* Proteus vulgaris *and Their Enzymatic Properties.—Journal of Bacteriology*, págs. 273-275, vol. 45, núm. 3 march 1943. I. E.

196
KAZAL (LOUIS A.).—*The Metabolism of* Pseudomonas fluorescens *as Interpreted by the Relationship between Metabolic End Products and the Electrical Conductivity of the Culture Medium.—Journal of Bacteriology*, págs. 277-292, vol. 45, núm. 3 march 1943. I. E.

197
ORDAL (E. J.) and DEROMEDIN (F.).—*Studies on the Action Wetting Agents on Microorganisms. II. The Synergistic Effect of Synthetic Wetting Agents on the Germicidal Action of Halogenated Phenols.—Journal of Bacteriology*, págs. 293-299, vol. 45, núm. 3 march 1943. I. E.

198
GRAY (P. H. H.).—*Staining Bacterial Capsules.—Journal of Bacteriology*, págs. 301, vol. 45, núm. 3 march 1943. I. E.

199
REED (G. B.) and ORR (J. H.).—*Cultivation of Anaerobes and Oxidation-Reduction Potentials.—Journal of Bacteriology*, págs. 309, vol 45, núm. 4 april 1943. I. E.

200
LANKFORD (CHARLES E.), SCOTT (VIRGINIA), COX (MARY F.) and COOKE (WILLARD R.).—*Some Aspects of Nutritional Variation of the Gonococcus.—Journal of Bacteriology*, págs. 321, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

201
LEONIAN (LEON H.) and GREENE LILLY (VIRGIL).—*Induced Autotrophism in Yeast.—Journal of Bacteriology*, págs. 329, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

202
TOBLER (ALICE) and PINNER (MAX).—*The Effect of Pleural Effusions on the Growth of* Staphylococcus aureus in vitro.—*Journal of Bacteriology*, págs. 341, vol 45, núm. 4 april 1943. I. E.

203
KNAYSI (GEORGES) and MUDD (STUART).—*The Internal Structure of Certain Bacteria as Revealed by the Electron Microscope-a Contribution to the Study of the Bacterial Nucleus.—Journal of Bacteriology*, págs. 349, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

204
TAMURA (JOSEPH T.) and GIBBY (INVIN W.).—*Cultivation of* Pasteurella tularensis *in Simplified Liquid Medium.—Journal of Bacteriology*, págs. 361, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

205
SPANGLER (C. D.) and WINSLOW (C.-E. A.).—*The Influence of The Sodiuu Ion on the Viability of Washed Cells of* Bacillus cereus.—*Journal of Bacteriology*, págs. 373, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

206
LAMANNA (CARL) and SHAPIRO (IRVING M.).—*Sulfanilamide Bacteriostasis in the Presence of Mercuric Chloride and p-Aminobenzoic Acid.—Journal of Bateriology*, págs. 385, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

207
NELSON (F. E.).—*Factors Which influence the Growth of Heat-Treated Bacteria I. A. Comparison of Four Agar Media.—Journal of Bacteriology*, págs. 395, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

208
CHAPMAN (GEORGE H.).—*Determination of the Chromogenic Property of Staphylococci.—Journal of Bacteriology*, págs. 405, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

209
CAMPBELL (THRESSA) AND HOFER (A. W.).—*A Medium Adapted to the Bacteriophage of* Rhizobium leguminosarum.—*Journal of Bacteriology*, págs. 406, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

210
BOTTCHER (ELIZABETH J.) AND HOFER (A. W.).—*Semi-Quantitative Determinations of Bacteriophage in Soils.—Journal of Bacteriology*, págs. 407, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

211
FOSTER (JACKSON W.) AND WOODRUFF (H. BOYD.)—*Quantitative Estimation of Streptothricin.—Journal of Bacteriology*, págs. 408, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

212
LANKFORD (CHARLES E.) AND SNELL (ESMOND E.).—*Glutamine as a Growth Factor for Certain Strains of* Neisseria gonorrhoeae.—*Journal of Bacteriology*, págs. 410, vol. 45, núm. 4 april 1943. I. E.

213
BURKE (VICTOR), SWARTZ (HERMAN) AND KLISE (KATHERINE S.).—*Morphological Life Cycle of a Staphylococcus-Like Organism and Modification of the Cycle.—Journal of Bacteriology*, págs. 415, vol. 45, núm. 5 may 1943. I. E.

214
WHITE (EDWIN C.) AND HILL (JUSTINA H.).—*Studies on Antibacterial Products Formed by Molds. I. Aspergillic Acid, a Product of a Strain of* Aspergillus flavus.—*Journal of of Bacteriology*, págs. 433, vol. 45, núm. 5 may 1943. I. E.

215
SMILEY (K. L.), NIVEN (C. F.) AND SHERMAN (J. M.).—*The Nutrition of* Streptococcus salivarius.—*Journal of Bacteriology*, págs. 445, vol 45, núm. 5 may 1943. I. E.

216
BREED (ROBERT S.).—Micrococcus rubens *Migula* 1900.—*Journal of Bacteriology*. págs. 455, vol. 45, núm. 5 may 1943. I. E.

217
ROGOSA (M.).—*Synthesis of Biboflavin by Lactose-Fermenting Yeasts.—Journal of Bacteriology*, págs. 459, vol. 45, núm. 5 may 1943. I. E.

218
JONES (HELEN), RAKE (GEOFFREY) AND HAMRE (DOROTHY M.).—*Studies on* Aspergillus flavus. *I Biological Properties of Crude and Purified Aspergillic Acid.—Journal of Bacteriology*, págs. 461, vol. 45, núm. 5 may 1943. I. E.

219
LEVINE (MAX).—*The Effect of Concentration of Dyes on Differentiation of Enteric Bacteria on Eosin Methylene Blue Agar.—Journal of Bacteriology*, págs. 471, vol. 45, núm. 5 may 1943. I. E.

220
RAKIETEN (TONY L.) AND RAKIETEN (MORRIS L.).—*Bacteriophage in the Developing Chick Embryo.—Journal of Bacteriology*, págs. 477, vol. 45, núm. 5 may 1943. I. E.

221
CURRAN (H. R.), BRUNSTETTER (B. C.) AND MYERS (A. T.).—*Spectrochemical Analysis of Vegetative Cells and Spores of Bacteria.—Journal of Bacteriology*, págs. 485, vol. 45, núm. 5 may 1943. I. E.

222
DEWEY (BARTLETT T.) AND POE (CHARLES F.).—*A Simple Artificial Medium for Pigment Production.—Journal of Bacteriology*, págs. 495, vol. 45, núm. 5 may 1943. I. E.

223
GILILLAND (J. RICHARD) AND VAUGHN (REESE H.).—*Biochemical Characteristics of Pigmented Coliform Bacteria.—Journal of Bacteriology*, pégs. 499, vol. 45, núm. 5 may 1943. I. E.

224
STARKEY (ROBERT L.) AND WAKSMAN (SELMAN A.).—*Fungi Tolerant to extreme Acidity and High Concentrations of Copper Sulfate.—Journal of Bacteriology*, págs. 509, vol. 45, núm. 5 may 1943. I. E.

225
LEONARD (LEWIS T.).—*A Simple Assembly for Use in the Testing of Cultures of Rhizobia.—Journal of Bacteriology*, págs. 523, vol. 45, núm. 6 june 1943. I. E.

226
HADLEY (PHILIP) AND WETZEL (VERNA).—*Conditions Contributing to Streptococcal Virulence: I. Conditions Contributing to Intra-Phasic Contrasted with Inter-Phasic Variation.—Journal of Bacteriology*, págs. 529, vol. 45, núm. 6 june 1943. I. E.

227
ROSENTHAL (L.).—*The Agglutinating Properties of* Escherichia coli: *Agglutination of Erythrocytes, Leucocytes, Thrombocytes, Spermatozoa, Spores of Molds, and Pollen by Strains of* E. coli.—*Journal of Bacteriology*, págs. 545, vol. 45, núm. 6 june 1943. I. E.

228
QUORTRUP (E. R.) AND SUDHEIMER (R. L.).—*Some Ecological Relations of* Pseudomonas aeruginosa *to* Clostridium botulinum *Type C.—Journal of Bacteriology*, páginas 551, vol. 45, núm. 6 june 1943. I. E.

229
ZOBELL (CLAUDE) AND GRANT (CAROL W.).—*Bacterial Utilization of Low Concentrations of Organic Matter.—Journal of Bacteriology*, págs. 555, vol. 45, núm. 6 june 1943. I. E.

230
FULLER (W. H.) AND NORMAN (A. G.).—*Characteristics of Some Soil Cytophagas.—Journal of Bacteriology*, págs. 565, vol. 45, núm. 6 june 1943. I. E.

231
SHEMA (F.) AND APPLING (JOHN W.).—*The Increased Resistance of Aerobacter aerogenes to Sodium Pentachlorophenate.—Journal of Bacteriology*, págs. 573, vol. 45, núm. 6 june 1943. I. E.

232
LOCHHEAD (A. G.).—*Note on the Taxonomic Position of the Red Chromogenic Halophilic Bacteria.—Journal of Bacteriology*, págs. 574, vol 45, núm. 6 june 1943. I. E.

233
JONES (F. G.).—*A Complete Culture Medium Prepared from Human Red Cells.—Journal of Bacteriology*, págs. 575, vol. 45, núm. 6 june 1943. I. E.

234
CRECELIUS (H. GILBERT) AND RETTGER (LEO F.).—*The Instestinal Flora of the Guinea Pig.—Journal of Bacteriology*, pág. 1, vol. 46, núm. 1, july 1943. I. E.

235
MUNDD (STUART), POLEVITZKY (KATHERINE) AND ANDERSON (THOMAS F.). *Bacterial Morphology as Shown by the Electron Microscope. V. Treponema pallidum T. macrodentium* and *T. microdentium.—Journal of Bacteriology*, pág. 15, vol. 46, núm. 1, july 1943. I. E.

236
SOKHEY (S. S.) AND HABBU (M. K.).—*Optimum and Limiting Temperatures for the Growth of the Plague Bacillus in Broth.—Journal of Bacteriology*, pag. 25, vol 46, núm. 1 juli 1943. I. E.

237
SOKHEY (S. S.) AND HABBU (M. K.).—*Optimum and Limiting Hydrogen Ion Concentrations for the Growth of the Plague Bacillus in Broth.—Journal of Bacteriology*, pág. 33, vol. 46, núm. 1 july 1943. I. E.

238
ZOBELL (CLAUDE E.).—*The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity.—Journal of Bacteriolo gy*, pág. 39, vol. 46, núm. 1 july 1943. I. E.

239
LURIA (S. E.), DELBRUCK (M.) AND ANDERSON (T. F.).—*Electron Microscope Studies of Bacterial Viruses.—Journal of Bacteriology*, pág. 57, vol. 46, núm. 1 july 1943. I. E.

240
FULTON (MAC DONALD).—*The Identity of* Bacterium columbensis *Castellani.—Journal of Bacteriology*, pág. 79, vol. 46, núm. 1 july 1943. I. E.

241
STOKES (J. L.) AND WOODWARD JR. (C. R.).—*Formation of Tyrothricin in Submerged Cultures of* Bacillus brevis.—*Journal of Bacteriology*, pág. 83, vol. 46, núm. 1 july 1943. I. E.

242
McBEE (R. H.) AND SPECK (M. L.).—*An Anaerobic Culture Tube for Determining CO_2/H_2 Ratios of Coliform Bacteria.—Journal of Bacteriology*, pág. 89, vol. 46, núm.1 july 1943. I. E.

243
THOMPSON (ROY C.).—*The B. Vitamin Requirements of the Propionibacteria.—Journal of Bacteriology*, pág. 99, vol. 46, núm. july 1943. I. E.

244
STUART (C. A.) AND RUSTIGIAN (ROBERT).—*Further Studies on the Eijkman Reactions of* Shigella *Cultures.—Journal of Bacteriology*, pág. 105, vol. 46, núm. 1 july 1943. I. E.

245
WOOD (A. J.), BAIRD (ELIZABETH A.) AND KEEPING (FRANCES E.).—*A Primary Division of the Genus Shigella Based on the Trimethylamine Test.—Journal of Bacteriology*, pág. 106, vol. 46, núm. 1 july 1943. I. E.

246
SLAVIN (HOWARD B.).—*Persistence of the Virus of St. Louis Encephalitis in the Central Nervous System of Mice for Over Five Months.—Journal of Bacteriology*, pág. 113, vol. 46, núm. 2 august 1943. I. E.

247
KRUMWIEDE (ELMA).—*A Comparison of the Value of the Agglutination and Precipitin Reactions in the Serological Typing of Group A Streptococci.—Journal of Bacteriology*, pág. 117, vol. 46, núm. 2 august 1943. I. E.

248
CONN (JEAN E.).—*The Pigment Production of* Actinomyces coelicolor *and* A. violaceus-ruber.—*Journal of Bacteriology*, pág. 133, vol. 46, núm. 2 august 1943. I. E.

249
BUCCA (MATTHEW A.).—*The Effect of Germicides on the Viability and on the Respiratory Enzyme Activity of Gonococcus.—Journal of Bacteriology*, pág. 151, vol. 46, núm. 2 august 1943. I. E.

250
JOHNSON (FRANK H.), ZWORYKIN (NINA) AND WARREN (GEORGE).—*A Study of Luminous Bacterial Cells and Cytolysates with the Electron Microscope.—Journal of Bacteriology*, pág. 167, vol. 46, núm. 2 august 1943. I. E.

251
FOSTER (JACKSON W.) AND WOODRUFF (H. BOPD).—*Microbiological Aspects of Penicillin. I. Methods of Assays.—Journal of Bacteriology*, pág. 187, vol. 46, núm. 2 august 1943. I. E.

252
CANTOR (A.) AND SCHOBERT (WILLIAM).—*The Coagulation and Sterilization of Culture Media.—Journal of Bacteriology*, pág. 203, vol. 46, núm. 2 august 1943. I. E.

253
MUDD (STUART), HEINMETS (FERDINAND) AND ANDERSON (THOMAS F.).—*Bacterial Morphology as Shown by the Electron Microscope. VI. Capsule, Cell-Wall and Inner Protoplasm of Pneumococcus, Type III.—Journal of Bacteriology*, pág. 205, vol. 46, núm. 2 august 1943. I. E.

254
STANIER (R. Y.).—*A Note on The Taxonomy of* Proteus hidrophilus.—*Journal of Bacteriology*, pág. 213, vol. 46, núm. 2 august 1943. I. E.

255
Mc CLUNG (L. S.).—*On the Use of Hydrolyzed Wheat Mash for the Enrichment of* Clostridium acetobutylicum.—*Journal of Bacteriology*, pág. 214, vol. 46, núm. 2 august 1943. I. E.

256
Mc CLUNG (L. S.).—*Use of Dried Tissue in Beef Heart Medium for Anaerobic Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 215, vol. 46, núm. 2 august 1943. I. E.

257
BERNHEIM (FREDERICK) AND BERNHEIM (MARY L. C.).—*The Effect of Various Substances on the Oxidation of Certain Sugars and Pyruvic Acid by a Type I Avirulent Pneumococcus.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 225, vol. 46, núm. 3 september. 1943. I. E.

258
LEVIN (MARSHALL).—*Two Agar-less Media for the Rapid Isolation of* Corynebacterium *and* Neisseria.—*Journal of Bacteriology*, pág. 233, vol. 46, núm. 3 september 9143. I. E.

259
KOSER (STEWART A.) AND WRIGHT (MARJORY H.).—*Experimental Variation of Nicotinamide Requirement of Dysentery Bacilli.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 239, vol 46, núm. 3 september 1943. I. E.

260
BARKER (H. A.).—Streptococcus allantoicus *and the Fermentation of Allantoin.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 251, vol. 46, núm. 3 september 1943. I. E.

261
ARONSON (JOSEPH D.) AND ALDERMAN (ILO).—*The Occurrence and Bacteriological Characteristics of* S. marcescens *from a Case of Meningitis,*—*Journal of Bacteriology*, pág. 261, vol. 46, núm. 3 september 1943. I. E.

262
TOWNSEND (C. T.) AND ZUCH (T. L.).—*Studies on Agar Contamination as Affecting the Sterilization of Culture Media.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 269, vol. 46, núm. 3 september 1943. I. E.

263
FULLER (W. H.) AND NORMAN (A. G.) *Cellulose Decomposition by Aerobic Mesophilic Bacteria from Soil. I. Isolation and Description of Organisms.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 273, vol. 46, núm. 3 september 1943. I. E.

264
FULLER (W. H.) AND NORMAN (A. G.).—*Cellulose Decomposition by Aerobic Masophilic Bacteria from Soil. II Biochemical Studies on Filter Paper and Cellulose Preparations.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 281, vol. 46, núm. 3 september 1943. I. E.

265
FULLER (W. H.) AND NORMAN (A. G.).—*Cellulose Decomposition by Aerobic Mesophilic Bacteria from Soil. III. The Effect of Lignin.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 291, vol. 46, núm. 3 september 1943. I. E.

266
WAKSMAN (SELMAN A.).—*Production and Activity of Streptothricin.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 299, vol. 46, núm. 3 seprember 1943. I. E.

267
AISENBERG (MYRON S.) AND GRUBB (THOMAS C.).—*Poliomyelitis Induced by Inoculation of Tooth Pulp Cavities.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 311, vol. 46, núm. 3 september 1943. I. E.

268
MORTON (HARRY E.).—*The Use of «Pyrex» Brand Fritted Filters in Bacteriological Work.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 312, vol. 46, núm. 3 september 1943. I. E.

269
GILILLAND (RICHARD J.) AND VAUGHN (REESE H.).—*Characteristics of Butyric Acid Bacteria from Olives.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 315, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

270
GIESE (ARTHUR C.).—*Studies on the Nutrition of Dim and Bright Variants of a Species of Luminous Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 323, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

271
WISE (BOWMAN) AND KERBY (GRACE P.).—*Cultivation of Brucella from the Blood.—Journal of Bacteriology*, pág. 333, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

272
WAKSMAN (SELMAN A.) AND HENRICI (ARTHUR T.).—*The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes.—Journal of Bacteriology*, pág. 337, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

273
ALLEN PACKER (R.).—*The Use of Sodium Azide (NaN_3) and Crystal Violet in a Selective Medium for Streptococci and* Erysipelothrix rhusiopathiae.—*Journal of Bacteriology*, pág. 343, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

274
YOUNG (RAYMOND M.) AND RETTGER (LEO F.).—*Decomposition of Vitamin C by Bacteria.—Journal of Bacteriology*, pág. 451, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

275
FULTON (NacDONALD) AND HARRISON (PRESTON).—*The Characteristics of* Proteus ammoniae.—*Journal of Bacteriology*, pág. 365, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

276
SMITH (F. R.).—*Nutritional Studies on* Streptococcus lactis.—*Journal of Bacteriology*, pág. 369, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

277
MORTON (HARRY E.).—*An Improved Technic for Growing Microorganisms under Anaerobic Conditions.—Journal of Bacteriology*, pág. 373, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

278
FOSTER (JACKSON W.) AND WILKER (BERNARD L.).—*Microbilogical Aspects of Penicillin. II. Turbidimetric Studies on Penicillin Inhibition.—Journal of Bacteriology*, pág. 377, vol. 46, núm. 4 otober 1943. I. E.

279
WHEELER (S. M.) AND FOLEY (G. E.).—*A Note on Non-Group-A Streptococci Associated With Human Infections Journal of Bacteriology*, pág. 391, vol. 46 núm. 4 october 1943. I. E.

280
FISK (ROY R.) AND MORDVIN (OLGA E.).—*Digestion of Casein by Staphylococci on Milk Agar Containing Serum.—Journal of Bacteriology*, pág. 392, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

281
VAUGHN (REESE H.).—*Motility in the Genus* Acetobacter.—*Journal of Bacteriology*, pág. 394, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

282
BREWER (JOHN H.).—*Vegetable Bacteriological Media as Substitutes for Meat Infusion Media.—Journal of Bacteriology*, pág. 395, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

283
ANDERSON (A. A.).—*Recovery of Agar from Used Media.—Journal of Bacteriology*, pág. 396, vol. 46, núm. 4 october 1943. I. E.

284
KLIGLER (I. J.), GROSSOWICZ (N.) AND BERGNER (S.).—*Studies on the Role of Niaci and Thiamine in the Metabolism of Glucose by* Staphylococcus aureus.—*Journal of Bacteriology*, pág. 399, vol. 46, núm. 5 november 1943. I. E.

285
LINDEGREN (CARL C.) AND LINDEGREN (GERTRUDE).—*Selecting, Inbreeding, Recombining and Hybridizing Commercial Yeasts.—Journal of Bacteriology*, pág. 405, vol. 46, núm. 5 november 1943. I. E.

286
FOSTER (J. W.), WOODRUFF (H. B.) AND Mc DANIEL (L. E.).—*Microbiological Aspects of Penicillin. III. Production of Penicillin in Surface Cultures of* Penicillium notatum.—*Journal of Bacteriology*, pág. 421, vol. 46, núm. 5 november 1943. I. E.

287
ROGOSA (M.).—*Nicotinic Acid Requirements of Certain Yeasts.—Journal of Bacteriology*, pág. 435, vol. 46, núm. 5 november 1943. I. E.

288
GAINES (SIDNEY) AND STAHLY (GRANT L.).—*The Growth Requirements of* Leuconostoc mesenteroides *and Preliminary Studies on its Use as an Assay Agent for Several Members of the Vitamin B Complex.—Journal of Bacteriology*, pág. 441, vol. 46, núm 5 november 1943. I. E.

289
KNAYSY (GEORGES).—*A Cytological and Microchemical Study of* Thiobacillus thiooxidans.—*Journal of Bacteriology*, pág. 451, vol. 46, núm. 5 november 1943. I. E.

290
SCHADE (ARTHUR L.) AND CAROLINE (LEONA).—*The Preparation of a Polyvalent Dysentery Bacteriophage in a Dry and Stable Form. I. Preliminary Investigations and General Procedures.—Journal of Bacteriology*, pág. 463, vol. 46, núm. 5 november 1943. I. E.

291
REED (G. B.), ORR (J. H.) AND BROWN (HELEN J.).—*Fibrinolysins from Gas Gangrene Anaerobes.—Journal of Bacteriology*, pág. 475, vol. 46, núm. 5 november 1943. I. E.

292
WHEELER (KENNETH M.) AND BORMAN (EARLE K.).—*Two New Salmonelle Serotypes Isolated from Man.—Journal of Bacteriology*, pág. 481, vol. 46, núm. 5 november 1943. I. E.

293
SHWARTZMAN (GREGORY).—*Association of the Virus of Lymphocytic Choriomeningitis with Erythrocytes of Infected Animals.—Journal of Bacteriology*, pág. 482, vol. núm. 5 november 1943. I. E.

294
WYSS (ORVILLE).—*Antibacterial Action of a Pyridine Analogue of Thiamine.—Journal of Bacteriology*, pág. 483, vol. 46, núm. 5 november 1943. I. E.

295
STARKEY (ROBERT L.) AND WAKSMAN (SELMAN A.).—*Arthur Trautwein Henrici*, 1889-1943.—*Journal of Bacteriology*, pág. 489, vol. 46, núm. 6 december 1943. I. E.

296
SELEEN (W. A.) AND STARK (C. N.).—*Some Characteristics of Green- Fluorescent Pigment-Producing Bacteria.—Journal of Bacteriology*, pág. 491, vol. 46, núm. 6 december 1943. I. E.

297
WICKERHAM (LYNFERD J.).—*A Simple Technique for the Detection of Melibiose-Fermenting Yeasts.—Journal of Bacteriology*, pág. 501, vol. 46, núm. 6 december 1943. I. E.

298
Mc CLUNG (L. S.).—*On the Enrichment and Purification of Chromogenic Spore-Forming Anaerobic Bacteria.—Journal of Bacteriology*, pág. 507, vol. 46, núm. 6 december 1943. I. E.

299
EVANS (FRED R.) AND CURRAN (HAROLD R.).—*The Accelerating Effect of Sublethal Heat on Spore Germination in Mesophilic Aerobic Bacteria.—Journal of Bacterilogy.* pág. 513, vol. 46, núm. 6 december 1943. I. E.

300
ANTOINE (L. D.) AND HARGETT (M. V.).—*Machine for Shell Freezing Small Volumes of Biological Preparations.—Journal of Bacteriology*, págs. 525, vol. 46, núm. 6 december 1943. I. E.

301
HOLLAENDER (ALEXANDER).—*Effect of Long Ultraviolet and Short Visible Radiation (3500 to 4900 A) on* Escherichia coli.—*Journal of Bacteriology*, pág. 531, vol. 46, núm. 6 december 1943. I. E.

302
BUXBAUM (LILLIAN) AND FIEGOLI (NICHOLAS F.).—*Penicillin-Its Use in Media for the Isolation of* H. Influenzae *from Laryngeal Cultures in Obstructive Laryngitis.—Journal of Bacteriology*, pág. 543, vol. 46, núm. 6 december 1943. I. E.

303
WELLS (W. F.).—*Bacteriologic Procedures in Sanitary Air Analysis with Special Reference to Air Disinfection.—Journal of Bacteriology*, pág. 549, vol. 46, núm. 6 december 1943. I. E.

304
FEENEY (ROBERT E.), MUELLER (J. HOWARD) AND MILLER (PAULINE A.).—*Growth Requirements of* Clostridium tetani. *II. Factores Exhausted by Growth of the Organism.—Journal of Bacteriology*, pág. 559, vol. 46, núm. 6 december 1943. I. E.

305
FEENEY (ROBERT E.), MUELLER (J. HOWARD) AND MILLER PAULINE A.).—*Growth Requirements of* Clostridium tetani. *III. A «Synthetic» Medium.—Journal of Bacteriology*, pág. 563, vol. 46, núm. 6 december 9143. I. E.

306
KENNETH HORNER (C.) AND ALLISON (FRANKLIN E.).—*Utilization of Fixed Nitrogen by Azotobacter and Influence on Nitrogen Fixation.—Journal of Bacteriology*, pág. 1, vol. 47, núm. 1 january 1944. I. E.

307
VALKO (E. I.) AND DU BOIS (A. S.).—*The Antibacterial Action of Surface Active Cations.—Journal of Bacteriology*, pág. 15, vol, 47, núm. 1 january 1944. I. E.

308
FOSTER (JACKSON W.).—*Microbiological Aspects of Riboflavin. I. Introduction. II. Bacterial Oxidation of Riboflavin to Lumichrome.—Journal of Bacteriology*, pág. 27, vol. 47, núm. 1 january 1944. I. E.

309
FOSTER (JACKSON W.) AND WOODRUFF (H. BOYD).—*Microbiological Aspects of Penicillin. VI. Procedure for the Cup Assay for Penicillin.—Journal of Bacteriology*, pág. 43, vol. 47, núm. 1 january 1944. I. E.

310
VERA (HARRIETTE D.).—*A Comparative Study of Materials Suitable for the Cultivation of Clostridia.—Journal of Bacteriology*, pág. 39, vol. 47, núm. 1 january 1944. I. E.

311
MILLER (C. PHILLIP) AND SCHAD (DORETTA).—*Germicidal Action of Daylight on Meningococci in the Dried State.—Journal of Bacteriology*, pág. 71, vol. 47, núm. 1 january 1944. I. E.

312
MILLER (C. PHILLIP) AND SCHAD (DORETTA).—*The Resistance of Meningococci to Drying.—Journal of Bacteriology*, pág. 77, vol. 47, núm. 1 january 1944. I. E.

313
BLUNDELL (GEORGE P.), ERF (LOWELL A.), JONES (HAROLD W.) AND HOBAN REGINA T.).—*Observations on the Effect of Ultra Violet Irradiation (Knott Technic) on Bacteria and Their Toxins Suspended in Human Blood and Appropriata Diluents.—Journal of Bacteriology*, pág. 85, vol. 47, núm. 1 january 1944. I. E.

314
PIKE (ROBERT M.) AND ZIMMERMAN FOSTER (ALICE).—*Demosntration of Sulfonamide Inhibitor Production by Bacteria on Agar Containing Sulfonamide.—Journal of Bacteriology*, pág. 97, vol. 47, núm. 1 january 1944. I. E.

315
EMMONS (C. W.).—*Misuse of the Name* Trichophyton rosaceum *for a Saprophytic* Fusarium.—*Journal of Bacteriology*, pág. 107, vol. 47, núm. 1 january 1944. I. E.

316
TOBIE (WALTER C.) AND AYRES (GILBERT B.).—*Lack of Correlation between Plate Tests and Phenol Coefficient Determinations on Germicides and Antiseptics.—Journal of Bacteriology*, pág. 109, vol. 47, núm. 1 january 1944. I. E.

317
FOLEY (E. J.), EPSTEIN (JEANNE A.) AND LEE (S. W.).—*Effectiveness of Penicillin on* Listerella.—*Journal of Bacteriology*, pág. 110, vol. 47, núm. 1 january 1944. I. E.

318
MURRAY (H. C.).—*Aerobic Decomposition of Cellulose by Thermophilic Bacteria.—Journal of Bacteriology*, pág. 117, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

319
MORTON (HARRY E.) AND SOMMER (HARRIET E.).—*The Variation of Group C Hemolytic Streptococci.—Journal of Bacteriology*, pág. 123, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

320
STOKINGER (HERBERT E.), ACKERMAN (HELEN) AND CARPENTER (CHARLES M.).—*Studies on the Gonococcus. I. Constituents of the Cell.—Journal of Bacteriology*, pág. 129, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

321
STOKINGER (HERBERT E.), ACKERMAN (HELEN) AND CARPENTER (CHARLES M.).—*Studies on the Gonococcus. II. Properties of an Antigenic Fraction Isolated from Cell-Free Gonococcal Broth Supernatans.—Journal of Bacteriology*, pág. 141, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

322
STOKINGER (HERBERT E.), CARPENTIER (CHARLES M.) AND PLACK (JANE). *Studies on the Gonococcus. III. Quantitative Agglutinative Reactions of the Neisseria with Special Reference to* Neisseria gonorrhoeae.—*Journal of Bacteriology*, pág. 149, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

323
ROGOSA (M.).—*Vitamin Requirements of Lactose-Fermenting and Certain Other Yeasts. Journal of Bacteriology*, pág. 159, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

324
BLAKE CHRISTENSEN (W.) AND HOWARD GOWEN (G.).—*An Arabinose-Fermenting Bacterium of the Lactose- Negative, Mannitol-Negative Shigella Group.—Journal of Bacteriology*, pág. 171, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

325
HOFFMANN (C. E.) AND RAHN (OTTO).—*The Bactericidal and Bacteriostatic Action of Crystal Violet.—Journal of Bacteriology*, pág. 177, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

326
Mc KEE (CLARA M.), RAKE (GEOFFREY) AND HOUCK (CAROL L.).—*Studies on* Aspergillus flavus. *II. The Production and Properties of a Penicillin-Like Substance-Flavacidin.—Journal of Bacteriology*, pág. 187, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

327
SCHMIDT (WILLIAM S.) AND MOYER (ANDREW J.).—*Penicillin. I. Methods of Assay.—Journal of Bacteriology*, pág. 199, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

328
CHAPMAN (GEORGE H.).—*Coagulating Power of Staphylococci.—Journal of Bacteriology*, pág. 211, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

329
CHAPMAN (GEORGE H.).—*The Isolation of Pathogenic Staphylococci from Feces.—Journal of Bacteriology*, pág. 211, vol. 47, núm. 2 february 1944. I. E.

330
LICHSTEIN (HERMAN C.) AND SOULE (MALCOLM H.).—*Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration. I. The Action of Sodium Azide on Microbic Growth.—Journal of Bacteriology*, pág. 221, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

331
LICHSTEIN (HERMAN C.) AND SOULE (MALCOLM H.).—*Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration. II. The Action of Sodium Azide on Bacterial Catalase.—Journal of Bacteriology*, pág. 231, vol. 47, núm. 3, march 1944. I. E.

332
LICHSTEIN (HERMAN C.) AND SOULE (MALCOLM H.).—*Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration. III. The Effect of Sodium Azide on the Gas Metabolism of* B. subtilis *and* P. aeruginosa *and the Influence of Pyocyanine on the Gas Exchange of a Pyocyanine-Free Strain of* P. aeruginosa *in the Presence of Sodium Azide.—Journal of Bacteriology*, pág. 239, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

333

LICHSTEIN (HERMAN C.) AND SOULE (MALCOM H.).—*Studies of the Effec of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration. IV. The Effect of Sodium Azide on Glucose Fermentation and Lactic Acid Production by Streptococci and Lactobacilli.—Journal of Bacteriology*, pág. 253, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

334

HARTMANN (F. W.).—*Local Application of Sulfonamides to Experimental Staphylococcus Infections.—Journal of Bacteriology*, pág. 259, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

335

SKELTON (F. M.).—*The Combined Bacteriostatic Activity of Sulfanilamide and Azochloramid upon Streptococci in* in vitro *and* in vivo *Studies.—Journal of Bacteriology*, pág. 273, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

336

BAYLOR (M. R. B.), SEVERENS (J. M.) AND CLARK (G. L.).—*Electron Microscope Studies of the Bacteriophage of* Salmonella pullorum.—*Journal of Bacteriology*, pág. 277, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

337

GORDON GULD (R.), KANE (LEWIS W.) AND HOWARD MUELLER (J.).—*On the Growth Requirements of* Neisseria gonorrhoeae.—*Journal of Bacteriology*, pág. 287, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

338

STOKES (J. L.), GUNNESS (MARION) AND FOSTER (J. W.).—*Vitamin Content of Ingredients of Microbiological Culture Media.—Journal of Bacteriology*, pég, 293, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

339

BARKER (H. A.) AND HASS (VICTORIA).—*Butyribacterium, a New Genus of Gram-Positive, Non-Sporulating Anaerobic Bacteria of Intestinal Origin.—Journal of Bacteriology*, pág. 301, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

340

BARKER (H. A.) AND PETERSON (W. H.).—*The Nutritional Requirements of Clostridium acidi-urici.—Journal of Bacteriology*, pág. 307, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

341

WAKSMAN (SELMAN A.) AND REILLY (H. CHRISTINE).—*A Rapid and Accurate Method for Testing Penicillin Production by Different Strains of* P. notatum.—*Journal of Bacteriology*, pág. 308, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

342

WOOD (A. J.) AND KEEPING (FRANCES E.).—*The Formation of Trimethylamine from Choline as a Characteristic of* Shigella alkalescens.—*Journal of Bacteriology*, pág. 309, vol. 47, núm. 3 march 1944. I. E.

343

GUGGENHEIM (KARL).—*Investigations on the Dehydrogenating Properties of Certain Pathogenic Obligate Anaerobes.—Journal of Bacteriology*, pág. 313, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

344

HORMAECHE (E.), PELUFFO (C. A.) AND RICAUD DE PEREYRA (V.).—*A New Salmonella Type,* Salmonella carrau, *with Special Reference to the* 1,7... *Phases of the Kaufmann-White Classification.—Journal of Bacteriology*, pág. 323, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

345

LAMANNA (CARL).—*A Non-Life Cycle Explanation of the Diphteroid Streptococcus from Endocarditis.—Journal of Bacteriology*, pág. 327, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

346

NIVEN (C. F.), JR. AND SHERMAN (J. M.).—*Nutrition of the Enterococci.—Journal of Bacteriology*, pág. 335, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

347

NIVEN (C. F.), JR.—*Nutrition of* Streptococus lactis.—*Journal, of Bacteriology*, pág. 343 vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

348
GORDON YOUNG (E.) AND HAWKINS (W. W.).—*The Decomposition of Allantoin by Intestinal Bacteria.—Journal of Bacteriology*, pág. 351, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

349
FOSTER (JACKSON W.).—*Oxidations of Alcohols by Non-Sulfur Photosynthetic Bacteria.—Journal of Bacteriology*, pág. 355, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

350
JOHNSON (FRANK H.) AND SCHWARZ (HORACE W.).—*Carbohydrate Utilization by Hydrocarbon Bacteria.—Journal of Bacteriology*, pág. 373, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

351
MORTON (HARRY E.).—*A New Style Assembly for Fritted Filters.—Journal of Bacteriology*, pág. 379, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

352
KNAYSI (GEORGES) AND GUNSALUS (I. C.).—*A Study of the So-Called Marburg and the Lawrence and Ford Strains of* Bacillus subtilis.—*Journal of Bacteriology*, pág. 381, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

353
WAKSMAN (SELMAN A.) AND GEIGER (WALTON B.).—*The Nature of the Antibiotic Substances Produced by* Aspergillus fumigatus.—*Journal of Bacteriology*, pág. 391, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

354
ALTURE-WERBER (E.).—*Use of Liver Extract as an Enrichment Factor for the Growth of Gonococci.—Journal of Bacteriology*, pág. 399, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

355
BENNET Mc MAHON (V.).—*Substitutes in Culture Media.—Journal of Bacteriology*, pág. 400, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

356
CHOLDEN (LOUIS S.).—*A Simplified Technique for the Agar Cup Assay of Penicillin Journal of Bacteriology*, pág. 402, vol. 47, núm. 4 april 1944. I. E.

357
TURFITT (G. E.).—*Microbiological Agencies in the Degradation of Steroids. I. The Cholesterol-Decomposing Organisms of Soils.—Journal of Bacteriology*, pág. 487, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

358
OLSON (CARL), JR. AND WARREN (FREDERICK G.).—*Mechanical Aids in the Direct Microscopic Method of Counting Bacteria.—Journal of Bacteriology*. pág. 495, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

359
BARTHOLOMEW (W. V.) AND NORMAN (A. G.).—*Microbial Thermogenesis in the decomposition of Plant Materials. Part III. Simplified Equipment for Routine Studies.—Journal of Bacteriology*, pág. 499, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

360
HARDEN SVEC (MURIEL).—*Bovine Intracutaneous and Serological Reactions to Fractions of* Trichomonos foetus *(Protozoon).—Journal of Bacteriology*, pág. 505, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

361
BADGER (ELIZABETH).—*The Nutritional Requirements of a Strain of Type III* Pneumococcus.—*Journal of Bacteriology*, pág. 509, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

362
ANDERSON (CHARLES R.).—*Survival of* Rickettsia prowazeki *in Different Diluents.—Journal of Bacteriology*, pág. 519, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

363
JAMIESON WEISS (LUCILE).—*Electron Micrographs of Pleuropneumonia-Like Organisms.—Journal of Bacteriology*, pág. 523, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

364
TAMURA (JOSEPH T.).—*The Action of Sulfonamides and of Para-Aminobenzoic Acid on* Bacterium tularense.—*Journal of Bacteriology*, pág. 529, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

365

GINGRICH (WENDELL) AND SCHLENK (FRITZ).—*Codehydrogenase I and Other Pyridinium Compounds as V-Factor for* Hemophilus influenzae *and* H. parainfluenzae. *Journal of Bacteriology*, pág. 535, vol. 47, núm. 6, june 1944. I. E.

366

JOHNSON (FRANK H.).—*Observations on the Electron Microscopy of* B. cereus, *and Tyrothricin Action.—Journal of Bacteriology*, pág. 551, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

367

ALLEN (PAUL J.), NAGHSKI (J.) AND HOOVER SAM R.).—*Decomposition of Guayule Resins by Microorganisms.—Journal of Bacteriology*, pág. 559, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

368

EPSTEIN (JEANNE A.), FOLEY (E. J.) AND LEE (S. W.),—*The Effect of Penicillin on Experimental Streptococcus, Pneumococcus and Staphylococcus Infections of the Egg Embryo.—Journal of Bacteriology*, pág. 573, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

369

EDWARDS (P. R.) AND HUGHES (HOPE).—*A New* Salmonella *Type Isolated from Man and Fowls.—Journal of Bacteriology*, pág. 574, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

370

GOHAR (M. A.).—*A Staining Method for* Corynebacterium diphteriae.—*Journal of Bacteriology*, pág. 575, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

371

WEIL (A. J.) AND BLACK (J.).—*Species Differentiaton within the Genus* Shigella *by Test for Reduction of Trimethylamine Oxide.—Journal of Bacteriology*, pág. 575, vol. 47, núm. 6 june 1944. I. E.

Impreso en
Talleres
Gráficos
Montaña
Madrid